



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

2018

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

ԽՄԲԱԳՐԱԿԱՆ ԽՈՐՀՈՒՐԴ

Յու.Թ. Ալեքսանյան, Մ.Ա. Դավթյան, Ջ.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.Գ. Եսայան (*ответственный секретарь*), Գ. Գ. Գևորգյան, Ա.Ա. Թրչունյան, Լ.Ր. Մանվելյան, Ս.Մ. Մայրապետյան, Ջ.Ա. Վարդանյան

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

THE EDITORIAL BOARD

Editor in chief: E.S. Gevorgyan, *Vice-editor:* R.M. Aroutiunian,
Secretary-in-charge: A.H. Yesayan, *Members of the Board:* G.G. Gevorgyan,
A.H. Trchounian, L.R. Manvelyan, S.Kh. Mayrapetyan, Zh.H. Vardanyan.

THE EDITORIAL COUNCIL

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

• Փորձարարական և տեսական հոդվածներ •

Անտոնյան Ա.Պ., Թորոսյան Մ.Ա., Կարապետյան Ա.Թ. Եռակի համակարգերում տարբեր ինտերկալյատորների փոխազդեցությունը ԴՆԹ-ի հետ.....	6
Սարգսյան Ա.Ս., Բաբայան Բ., Ավետիսյան Ն.Ս., Մկրտչյան Ա.Գ., Հովհաննիսյան Ա.Մ., Հովհաննիսյան Ն.Ա. Հետերոցիկլային տեղակալված ոչ սպիտակուցային ամինաթթուները որպես <i>Clostridium histolyticum</i> -ի կոլագենազի արգելակիչներ...	12
Գևորգյան Է.Ս., Յավրոյան Ժ.Վ., Հակոբյան Ն.Ռ., Հովհաննիսյան Ա.Գ., Սարգսյան Է.Գ. Ցիսպլատինի <i>in vivo</i> ազդեցությունը առնետի ուղեղի բջիջների կորիզային թաղանթի լիպիդների բաղադրության վրա.....	16
Հակոբյան Ս.Ն., Քալանթարյան Վ.Պ., Բաբայան Յ.Ս. Ոչ ջերմային միլիմետրային էլեկտրամագնիսական ճառագայթման ազդեցությունը նուկլեինաթթուների հետ լիզանդների կապման թերմոդինամիկական պարամետրերի վրա.....	22
Գալստյան Մ.Հ., Թունյան Գ.Գ., Սանթրոսյան Գ.Ս. Ֆոսֆորական և կալիումական պարարտանյութերի ֆոնի վրա ազդողական պարարտանյութի կիրառման ժամկետների ազդեցությունը աշնանացան ցորենի որոշ ցուցանիշների վրա.....	28
Համբարձումյան Ա.Ա. Ֆերմենտային կինետիկայի վիճակագրական վերլուծություն. արգելակում.....	35
Վարդանյան Ժ.Հ., Մխիթարյան Հ.Կ. Հյուսիսարևելյան Հայաստանի մերձալպյան գոտու ծառաբույսերը և դենդրոցենոզները.....	45
Կարապետյան Լ.Գ., Հարությունյան Հ.Ա., Անտոնյան Ա.Ա., Շարոյան Ս.Գ., Մարդանյան Ս.Ս. Բուսական պատրաստուկների <i>in vitro</i> և <i>in vivo</i> ազդեցությունը դիպեպտիդիլպեպտիդազ IV-ի և ադենոզինդեամինազի ակտիվությունների վրա.....	52
Պանջուլազյան Կ.Ա., Հարությունյան Ա.Ա., Ասատրյան Մ.Ռ. Մարզիկների բնավորության տեսակների հոգեֆիզիոլոգիական որոշումը պոլիգրաֆի կիրառմամբ.....	60
Սիմոնյան Ռ.Մ., Բաբայան Մ.Ա., Սիմոնյան Գ.Մ., Հարությունյան Ա.Վ., Աբրահամյան Ռ.Ա., Սիմոնյան Մ.Ա. Մարդու երակային և ընկերքային I-IV խմբերի արյունից անջատած ՆԱԴՊԻH օքսիդազի և սուպրոլի մակարդակի և սուպերօքսիդի-գոյացման ակտիվության ոչ նույնանման փոփոխությունները.....	67
Քնարյան Վ.Հ. Կալպահինի դերը ողնուղեղի դեգեներացիայում փորձարարական Պարկինսոնի հիվանդության ժամանակ.....	75
Ադամյան Ն.Յու., Կարապետյան Մ.Ա., Սարգսյան Ռ.Շ., Հայրապետյան Տ.Ա. Օրգանիզմի ինտեգրատիվ ցուցանիշների փոփոխությունը թթվածնային անբավարարության պայմաններում նեփրոտալի և ուրեմիայի կիրառմամբ.....	85
Թադևոսյան Ա.Ա., Պետրոսյան Լ.Ն., Շահինյան Մ.Ա., Քանարյան Գ.Լ. Ոչ ջերմային էլեկտրամագնիսական ալիքների ազդեցությունը սարկոմա-45 ուռուցքից անջատված ԴՆԹ-ի ջերմակայունության վրա.....	90
Հակոբյան Ռ.Հ. Հոմեոպաթիայի տեսական հիմնավորման հայեցակարգ.....	95
Մանուկյան Ռ.Ռ., Շողունց Ա.Բ. Ազդողական պարարտանյութերի աճող չափաբանակների կիրառման ազդեցությունը հաճարի բերքատվության վրա Սիսիանի տարածաշրջանի անջրդի պայմաններում.....	100

• Նոր գիրքեր •

Ավետիսյան Վ.Ե. «Մատենագիտություն Հայաստանի Հանրապետությունում սևկաբանական գիտական աշխատանքների (1889-2014)».....	104
--	-----

СОДЕРЖАНИЕ

•Экспериментальные и теоретические статьи•

<i>Антонян А.П., Торосян М.А., Карапетян А.Т.</i> Взаимодействие различных интеркаляторов с ДНК в тройных системах	6
<i>Саргсян А.С., Бабян Б.Г., Аветисян Н.С., Мкртчян А.Г., Оганесян А.М., Оганесян Н.А.</i> Гетероциклически замещенные небелковые аминокислоты как ингибиторы коллагеназы из <i>Clostridium histolyticum</i>	12
<i>Геворгян Э.С., Явроян Ж.В., Акопян Н.Р., Оганесян А.Г., Саргсян Э.Г.</i> <i>In vivo</i> действие цисплатина на липидный состав ядерной мембраны в клетках мозга крыс.....	16
<i>Акопян С.Н., Калантарян В.П., Бабян Ю.С.</i> Влияние нетеплового миллиметрового электромагнитного излучения на термодинамические параметры связывания лигандов с нуклеиновыми кислотами.....	22
<i>Галстян М.А., Тунян Г.Г., Сантросян Г.С.</i> Влияние сроков внесения азотного удобрения на фоне фосфорного и калийного удобрений на некоторые показатели озимой пшеницы.....	28
<i>Амбарцумян А. А.</i> Статистический анализ ферментативной кинетики: ингибирование.....	35
<i>Варданян Ж.А., Мхитарян А.К.,</i> Древесные растения и дендроценозы субальпийской зоны Северо-восточной Армении	45
<i>Карапетян Л.Г., Арутюнян А.А., Антонян А.А., Шароян С.Г., Марданян С.С.</i> <i>In vitro</i> и <i>in vivo</i> влияние растительных препаратов на активность дипептидилпептидазы IV и аденозиндезаминазы.....	52
<i>Панчулазян К.А., Арутюнян А.А., Асатрян М.Р.</i> Психофизиологическое определение типов характера спортсменов с применением полиграфа.....	60
<i>Симонян Р.М., Бабян М.А., Симонян Г.М., Арутюнян А.В., Абрамян Р.А., Симонян М.А.</i> Неидентичные изменения уровня и супероксид-продуцирующей активности изоформ NADPH оксидазы и супрола из венозной и плацентарной крови I-IV групп человека.....	67
<i>Княрян В.А.</i> Роль кальпаина в дегенерации спинного мозга при экспериментальной болезни Паркинсона.....	75
<i>Адамян Н.Ю., Карапетян М.А., Саркисян Р. Ш., Айрапетян Т.А.</i> Изменение интегративных показателей организма при кислородной недостаточности в условиях воздействия нембутала и уретана.....	85
<i>Тадевосян А.А., Петросян Л.Н., Шагинян М.А., Канарян Г.Л.</i> Влияние нетеплового миллиметрового электромагнитного излучения на термостабильность ДНК опухоли саркомы 45	90
<i>Акопян Р.А.</i> Концепция теоретического обоснования гомеопатии.....	95
<i>Манукян Р.Р., Шогунц А. Б.</i> Внедрение азотных удобрений и их воздействие на увеличение нормы урожайности полбы в условиях неоросаемости в Сисианском регионе	100

•Новые книги •

<i>Аветисян В.Е.</i> “Библиография научных работ по микологии в Республике Армения (1889-2014)”.....	104
--	-----

CONTENTS

•Experimental and theoretical articles•

<i>Antonyan A.P., Torosyan, M.A. Karapetyan A.T.</i> Interaction of different intercalators with DNA in three-component systems.....	6
<i>Sargsyan A.S., Babayan B., Avetisyan N.S., Mkrtchyan A.G., Hovhannisyan A.M., Hovhannisyan N.A.</i> Heterocyclic substituted non-protein amino acids as inhibitors of <i>Clostridium histolyticum</i> collagenase.....	12
<i>Gevorgyan E.S., Yavroyan Zh.V., Hakobyan N.R., Hovhannisyan A.G., Sargsyan E.G.</i> <i>In vivo</i> action of cisplatin on lipid content in nuclear membranes from rat brain cells.....	16
<i>Hakobyan S.N., Kalantaryan V.P., Babayan Y.S.</i> Effect of non-thermal millimeter electromagnetic radiation on thermodynamic parameters of the binding of ligands with nucleic acids	22
<i>Galstyan M.H., Tunyan G.G., Santrosyan G.S.</i> The impact of the application periods of nitrogenous fertilizers in the background of phosphorus and potassium fertilizers on some indicators of winter wheat	28
<i>Hambardzumyan A.A.</i> Statistical analyses of enzyme kinetics: inhibition.....	35
<i>Vardanyan Zh. H., Mkhitarian H.K.</i> Wood plants and dendrocoenoses of the subalpine belt of North-Eastern Armenia.....	45
<i>Karapetyan L.G., Harutyunyan H.A., Antonyan A.A., Sharoyan S.G., Mardanyan S.S.</i> <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> influence of plant preparations on dipeptidyl peptidase IV and adenosine deaminase activities.....	52
<i>Panchulazyan K.A., Harutyunyan A.A., Asatryan M.R.</i> Psycho-physiological definition of the character types of athletes with use of polygraph.....	60
<i>Simonyan R.M., Babayan M.A., Simonyan G.M., Arutiunyan A.W., Abraamyan R.A., Simonyan M.A.</i> Nonidentical changes of the level and superoxide-producing activity of the isoforms of NADPH oxidase and superol from human venous and placental bloods of I-IV groups.....	67
<i>Knaryan V.H.</i> The role of calpain in spinal cord degeneration in experimental Parkinson's disease.....	75
<i>Adamyan N.J., Karapetyan M.A., Sarkisyan R.Sh., Hajrapetyan T.A.</i> The alteration of integrative signal's proofs on hypoxia with using nembutal and uretan.....	85
<i>Tadevosyan A.A., Petrosyan L.N., Shahinyan M.A., Kanaryan G.L.</i> The influence of non-thermal millimeter electromagnetic waves on thermostability of DNA extracted from sarcoma-45 tumor.....	90
<i>Hakobyan R.H.</i> Concept of the theoretical foundation of homeopathy.....	95
<i>Manukyan R.R., Shoghunts A.B.</i> The influence of the nitric fertilizers of the use of growing quantity on the wheat yield in the waterless conditions of the district of Sisian.....	100

•New books •

<i>Avetisyan V.E.</i> "Bibliography of scientific works on mycology in the Republic of Armenia (1889-2014)"	104
---	-----



Biolog. Journal of Armenia, 1 (70), 2018

INTERACTION OF DIFFERENT INTERCALATORS WITH DNA IN THREE-COMPONENT SYSTEMS

A.P. ANTONYAN¹, M.A. TOROSYAN², A.T. KARAPETYAN²

¹Department of Biophysics, Faculty of Biology, Yerevan State University

²Department of Physics and Electrical engineering, Yerevan State University
of Architecture and Construction
apant@ysu.am

The study of the joint binding of the intercalating compounds ethidium bromide (EtBr) and mitoxantrone (MTX) with DNA has been carried out. Melting parameters of the three-component system EtBr-DNA-MTX were obtained. Changes in the melting parameters of the complexes revealed that EtBr binds by several modes with ds-DNA both in the presence and in the absence of another intercalator. In the absence of EtBr, MTX binds to ds-DNA by semi-intercalation mode. At the joint binding of EtBr and MTX with ds-DNA a competition between ligands emerges, though the effect of EtBr on the melting parameters of the complexes becomes dominant.

DNA – ethidium bromide – mitoxantrone – joint binding – melting parameters

Իրականացվել է ԴՆԹ-ի հետ ինտերկալացվող միացություններ՝ էթիդիումի բրոմիդի (ԷԲ) և միտոքսանտրոնի (ՄՏԶ) համատեղ կապման ուսումնասիրություն: Ստացվել են ԷԲ-ԴՆԹ-ՄՏԶ եռակի համակարգերի հալման պարամետրերը: Կոմպլեքսների հալման պարամետրերի փոփոխությունները բացահայտել են, որ ԷԲ-ն ԷԶ-ԴՆԹ-ի հետ կապվում է մի քանի եղանակներով ինչպես այլ ինտերկալատորի առկայության, այնպես էլ բացակայության պայմաններում: ԷԲ-ի բացակայության դեպքում ՄՏԶ-ը ԷԶ-ԴՆԹ-ի հետ կապվում է կիսաինտերկալացիոն եղանակով: ԷԶ-ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի և ՄՏԶ-ի համատեղ կապման դեպքում լիգանդների միջև ի հայտ է գալիս մրցակցություն, սակայն ԷԲ-ի ազդեցությունը կոմպլեքսների հալման պարամետրերի վրա դառնում է դոմինանտ:

*ԴՆԹ – էթիդիումի բրոմիդ – միտոքսանտրոն – համատեղ կապում –
հալման պարամետրեր*

Проведено исследование совместного связывания интеркалирующих соединений бромистого этидия (БЭ) и митоксантрона (МТК) с ДНК. Получены параметры плавления комплексов тройных систем БЭ-ДНК-МТК. Изменения параметров плавления комплексов выявили, что БЭ связывается несколькими способами с дц-ДНК как в присутствии, так и в отсутствие другого интеркалятора. В отсутствие БЭ, МТК связывается с дц-ДНК полуинтеркаляционным способом. При совместном связывании БЭ и МТК с дц-ДНК возникает конкуренция между лигандами, однако доминирующим является влияние БЭ на параметры плавления комплексов.

*ДНК – бромистый этидий – митоксантрон – совместное связывание –
параметры плавления*

Study of RNA interaction with ligands that immediately bind to DNA nowadays is of big interest and is connected to the possibility to regulate thereby the processes taking place with RNA participation. It is known that some ligands significantly affect the biological functions of DNA, since they are mutagens (for instance, acridine dyes) or cancerogens, as well as inhibitors of transcription (for example, actinomycin and other antibiotics).

It is established that this effect is determined by the ability of these compounds to form slowly dissociating complexes with DNA. Inhibition of transcription is created by both difficulties for DNA untwisting and practical irreversibility of the complex formation in type of DNA-ligand [1,6,7,12-14]. From this point of view the interaction of these compounds with different RNA (being in single-, double-, triple- or tetra-stranded state) may have an important value.

Among ligands immediately binding to DNA the intercalators, including ethidium bromide (EtBr), acridine orange (AO), mitoxantrone (MTX) etc. are of special interest and have a wide application in the medicine as well [5,8-11,17,18].

One of the important problems is the study of the interaction of DNA with several ligands simultaneously. These problems are particularly valuable from that point of view that DNA in a cell is surrounded by different compounds that bind to it both by similar and by various mechanisms. Nowadays some data on simultaneous interaction of different ligands (in particular intercalator EtBr and groove binding compound Hoechst 33258, as well as two intercalators EtBr and methylene blue (MB)) with DNA are obtained [6,13]. Taking this fact into account the comparative studies of the interaction of wide range intercalators with ds-DNA are informative. The aim of the present work is to investigate the binding peculiarities of EtBr and MTX as well as EtBr and AO to ds-DNA

Materials and methods. Calf thymus DNA, poly(rA)-poly(rU), MTX, ("Sigma", USA), EtBr ("Serva", Germany) were used in experiments. All preparations were used without additional purification. Concentrations of the used preparations were determined by absorption method, using the following extinction coefficients: $\epsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for calf thymus DNA, $\epsilon_{480}=5800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for EtBr, $\epsilon_{659}=25000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for MTX. The experiments were carried out in water medium, containing 0.01 M Tris buffer, 0.1 M NaCl, pH=7.4.

Melting of the complexes of DNA with ligands as well as spectrophotometric measurements of absorption of the solutions of the preparations were carried out using PYE Unicam-SP-8-100 spectrophotometer (England). Heating of the solutions of the complexes was realized using program device SP 876 Series 2.

For spectrophotometric measurements quartz cuvettes were used with hermetically closing Teflon caps, 3 ml volume, and 1 cm optic pathway length. The melting was carried out at $\lambda=260$ nm wavelength for DNA corresponding to its maximal absorption. The values of the absorptions of the complexes at the melting were performed on PC monitor using the program elaborated in LabVIEW medium. The melting curves of the complexes were constructed as described [13].

DNA complexes with ligands were prepared taking into account the concentration ratio $r=[C]/[P]$, where C is ligand concentration (EtBr or MTX or joint EtBr-MTX), P – concentration of DNA phosphate groups. The values of r change in interval $0 < r \leq 0.33$. In the case of the joint binding of two intercalators to DNA the concentration of each ligand was taken twice less to prevent the similarity of the values of r with those values corresponding to the complexes of one ligand with DNA in the absence of another one.

Results and Discussion. Among biologically active compounds, interacting with DNA and significantly affecting its structural-functional characteristics, a special place belongs to classical intercalator EtBr, which binds not only in vitro, but also in vivo and inhibits the replication and transcription processes [5,8-11,14,17,18]. This ligand is an appropriate object for modeling of molecular mechanisms of the interaction of various

compounds with DNA, since the theoretical model of DNA helix-coil transition in the complex with EtBr elaborated in [6] allows to calculate the value of heat – ΔH via dependence of the change of T_m and ΔT on the ligand concentration. This theory also allows to carry out the complete thermodynamic analysis of DNA formed complexes with ligands that cannot bind by several modes [6]. This theoretical model revealed that EtBr forms three types of complexes with ds-DNA – intercalation, semi-intercalation and electrostatic. However, these binding modes of EtBr with DNA are universal, since their performance does not depend on the solution ionic strength, pH or other external factors [6,13].

This fact is important for DNA-EtBr system application as a fundament in studies of the interaction of different ligands both at separate and at joint interaction with NA.

To find out the peculiarities of EtBr and MTX joint binding with ds-DNA, the studies of DNA-ligand complexes have been carried out by UV melting method. Melting curves (the curves are not presented) were obtained based on which the melting parameters of DNA-ligand complexes were determined – melting temperature T_m and melting interval width ΔT . Change of these parameters depending on r ($r = \text{ligand}/\text{DNA}$) permits revealing the peculiarities of the binding of ligands to DNA. From this point of view the change of the melting interval width ($\delta(\Delta T/T_m^2)$) depending on ligand/DNA concentration ratio is certainly informative. Particularly, in the number of cases this parameter allows to find out the specificity of ligand to the certain sequences of DNA [15].

Dependence curves of $\delta(\Delta T/T_m^2)$ on r obtained for EtBr and MTX complexes with ds-DNA are presented in fig. 1. It is obvious from the presented figure that this dependence acquires a bell-like shape in the case of EtBr-DNA complexes (curve 1), since it enhances at ligand low concentrations and attaining to its maximal value at $r=0.1$ starts decreasing. In the case of MTX-DNA complexes an increase of $\delta(\Delta T/T_m^2)$ dependence on r at the ligand low concentrations ($0 < r \leq 0.05$) takes place, at further increase of this ligand concentration the dependence of $\delta(\Delta T/T_m^2)$ on r comes up to plateau (curve 2).

Another situation is observed in the case of EtBr and MTX joint binding to DNA. Particularly, it is obvious from the presented figure that the sum curve of $\delta(\Delta T/T_m^2)$ dependence on r practically has the same form as that for EtBr-DNA complexes (curve 4). The dependence of $\delta(\Delta T/T_m^2)$ on r corresponding to the complexes of EtBr-DNA-MTX (curve 3) qualitatively differs from the rest, since in this curve two regions are obvious: the first – in $0 < r \leq 0.17$ interval, the second – $0.17 < r \leq 0.33$. Moreover, it is obvious from the presented figure that in the interval of $0 < r \leq 0.1$ the dependence of $\delta(\Delta T/T_m^2)$ on r in the case of EtBr-DNA-MTX complexes increases, in the interval of $0.1 < r \leq 0.17$ it passes through the weakly expressed maximum, decreases, in the interval of $0.17 < r \leq 0.33$ it acquires a bell-like shape. Analogous effect was revealed at the joint interaction of EtBr and semi-intercalator methylene-blue (MB) with DNA [13]. Similarity of the obtained data allows to conclude that the main binding mechanism of MTX with ds-DNA as in the case of MB is semi-intercalation [2-4].

In [16] the dependencies of $\delta(\Delta T/T_m^2)$ on r of the complexes EtBr-DNA, AO-DNA and EtBr-DNA-AO were obtained. It becomes obvious from the obtained dependencies that in the case of EtBr-DNA-AO three-component system, the dependence of $\delta(\Delta T/T_m^2)$ on r is bell-like shaped as the curve corresponding to the complexes EtBr-DNA. Bell-like shape was also obtained at mathematical summation of the values of $\delta(\Delta T/T_m^2)$ for DNA-EtBr and DNA-AO complexes at corresponding values of r [16]. These data indicate that the intercalation mechanism mainly contributes to the stabilization of DNA ds-structure.

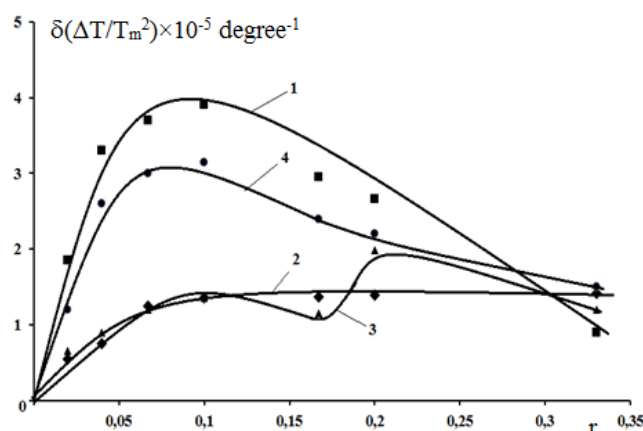


Fig. 1. Dependence curves of $\delta(\Delta T/T_m^2)$ on r of the complexes EtBr-DNA (1); MTX-DNA (2), EtBr-DNA-MTX (3) and DNA-EtBr + DNA-MTX (4).

The curve 4 is a mathematical sum of the values of $\delta(\Delta T/T_m^2)$ of the complexes DNA-EtBr and DNA- MTX at corresponding values of r .

At low concentrations of the ligand the sites for intercalation are not saturated and along with the melting a redistribution of the binding molecules from denatured regions of DNA to still non-denatured ones takes place. It results in increasing of the melting interval width of the complexes as compared to that of DNA. Along with ligand concentration enhancement with the saturation of the intercalation sites the redistribution ends due to which $\delta(\Delta T/T_m^2)$ attains to its maximum. In the case of AO and MTX (as well as MB) this effect is performed as the dependence curve of $\delta(\Delta T/T_m^2)$ on r comes up to plateau, while in the case of EtBr at further increase of the concentration this dependence starts decreasing [14]. This fact is conditioned by beginning of EtBr molecules to bind to DNA by semi-intercalation and electrostatic modes. From this point of view the result obtained at EtBr and AO joint binding to DNA is unexpected, since the values of $\delta(\Delta T/T_m^2)$, which are obtained for three-component system DNA-EtBr-AO and DNA-AO complex, less differ from each other in the interval $0.05 < r \leq 0.2$. We assume that in the case of the joint binding of AO and EtBr, the intercalated molecules of AO block the semi-intercalation binding sites for EtBr molecules. However, at further increasing of the concentration of both ligands ($0.2 \leq r$) the EtBr molecules begin binding with ss-regions of DNA, which in turn facilitates the helix-coil transition process. On the other hand, the obtained data indicate that the semi-intercalation binding type of AO to ds-DNA is not revealed (in the case of MTX as for MB the intercalation mode is not found out at analogous conditions). By the virtue of this we assume that the bell-like change of $\delta(\Delta T/T_m^2)$ dependence on r of DNA-EtBr complexes in the absence of other ligands is conditioned by the simultaneous performance of three – intercalation, semi-intercalation and electrostatic modes. In the presence of other ligands depending on their type (intercalator, semi-intercalator or non-intercalator), not all binding modes, characteristic for EtBr, may appear [13,14,16]. For performance or suppression of one or another binding mode of separate ligands in the presence of the other, the binding constant K plays an important role: in the case of AO and EtBr the values of K corresponding to the intercalation mode differ from each other by almost 5-10 times, due to which the effect of EtBr on the melting parameters of the complexes prevails at the high concentrations of ligands. On the other hand, the values of K , corresponding to the

semi-intercalation mode for EtBr are less than that corresponding to the intercalation for AO that is why this mode is suppressed in the interval $0.05 < r \leq 0.2$ at the joint binding of EtBr and AO with DNA. From this point of view, the dependence curve peculiarities of $\delta(\Delta T/T_m^2)$ on r for EtBr-DNA-MTX three-component system (as well as EtBr-DNA-MB [14]) are conditioned by the performance or suppression of the respective modes depending on values of K .

Thus, the obtained data indicate that the joint binding of different ligands with DNA is not a mathematical sum of their separate binding. Our obtained data also indicate that MTX binds to DNA by the mechanisms similar to MB, i.e. in the conditions of relatively high ionic strengths, at low concentrations MTX semi-intercalates into ds-structure of DNA, at high concentrations – it binds electrostatically from outside of the helix.

In the case of binding of intercalators, particularly EtBr and AO, it is revealed that these ligands differently affect the melting interval width of DNA. Though, in the presence of AO the semi-intercalation of EtBr molecules into ds-regions of DNA is suppressed, while into ss-regions it is performed at high concentrations. This fact indicates that at relatively high concentrations of both ligands and the joint binding to DNA, a competition between them emerges.

REFERENCES

1. *Aleksić M.M., Kapetanović V.* An overview of the optical and electrochemical methods for detection of DNA-drug interactions. *Acta Chim. Slov.*, 61, p. 555-573, 2014.
2. *Awasti P., Dogra S., Bartwal P.* Multispectroscopic methods reveal different modes of interaction of anticancer drug mitoxantrone with poly(dG-dC)-poly(dG-dC) and poly(dA-dT)-poly(dA-dT). *J. Photochem. Photobiol. B*, 127, p. 78-87, 2013.
3. *Babayan Y.S., Hakobyan S.N., Ghazaryan R.S., Shahinyan M.A.* Thermostability of DNA complexes with mitoxantrone at small fillings. *Biophys Rev and Lett.*, 12, 3, p. 141-149, 2017.
4. *Babayan Y.S., Manzini D.M., Kvadrifolio F.* Interaction of ethidium bromide with synthetic double-helical polyribonucleotides. *Molecular Biol.*, 22, 4, p. 898-910, 1988.
5. *Hossain M., Giri P., Kumar G.S.* DNA Intercalation by Quinacrine and Methylene blue: A Comparative Binding and Thermodynamic Characterization Study. *DNA and Cell Biology*, 27, 2, p. 81-90, 2008.
6. *Karapetian A.T., Mehrabian N.M., Terzikian G.A., Vardevanian P.O., Antonian A.P., Borisova O.F., Frank-Kamenetskii M.D.* Theoretical treatment of melting of complexes of DNA with ligands having several types of binding sites on helical and single-stranded DNA. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 14, 2, p. 275-283, 1996.
7. *Lane A.N., Jenkins T.C.* Thermodynamics of nucleic acids and their interactions with ligands. *Q. Rev. Biophys.*, 33, 3, p. 255-306, 2000.
8. *Nafisi Sh, Saboury A. A., Keramat N., Neault J.-F., Tajmir-Riahi H.-A.* Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. *Journal of Molecular Structure*, 827, p. 35-43, 2007.
9. *Nakamoto K., Tsuboy M., Strahan G.D.* Drug-DNA interactions: Structure and spectra, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA, p. 72-119, 2008.
10. *Rohs R., Sklenar H.* Methylene blue binding to DNA with alternating AT base sequence: Minor groove binding is favored over intercalation. *J. Biomol. Struct. & Dyn.*, 21, 5, p. 699-711, 2004.
11. *Tang Tz.- Ch, Huang H.-J.* Electrochemical Studies of the Intercalation of Ethidium Bromide to DNA. *Electroanalysis*, 11, 16, p. 1185-1190, 1999.
12. *Vardevanyan P.O., Antonyan A.P.* Study of DNA complexes with different ligands. *Biol. J. of Armenia*, 62, 3, p. 50-58, 2010.

13. Vardevanyan P., Antonyan A., Parsadanyan M., Shahinyan M., Melqonyan G. Behavior of Ethidium bromide-Hoechst 33258-DNA and Ethidium bromide-Methylene blue-DNA triple systems by means UV melting. *International Journal of Spectroscopy*, v. 2015, p. 1-5, 2015.
14. Vardevanyan P., Antonyan A., Parsadanyan M., Torosyan M., Karapetian A. Joint interaction of Ethidium Bromide and Methylene Blue with DNA. The effect of ionic strength on binding thermodynamic parameters. *J. of Biomol. Struct. and Dyn.*, 34, 7, p. 1377-1382, 2016.
15. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Hambardzumyan L.A., Shaniyan M.A., Karapetian A.T. Thermodynamic analysis of DNA complexes with methylene blue, ethidium bromide and Hoechst 33258. *Biopolymers and Cell*, 29, 6, p. 515-520, 2013.
16. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Sahakyan V.G. Study of the joint binding of acridine orange and ethidium bromide with DNA. *Reports of NAS RA*, 117, 1, p. 74-81, 2017.
17. Xinhui H., Wang Q., Pingang H., Fang Y. Spectroelectrochemistry study on the electrochemical reduction of ethidium bromide. *Analytical Sciences*, 18, p. 645-650, 2002.
18. Zhao G.C., Zhu J.J., Zhang J.J., Chen H.Y. Voltammetric studies of the interaction of methylene blue with DNA by means of β -cyclodextrin. *Anal Chim Acta*, 394, p. 337-344, 1999.

Received on 14.11.2017



HETEROCYCLIC SUBSTITUTED NON-PROTEIN AMINO ACIDS AS INHIBITORS OF *CLOSTRIDIUM HISTOLYTICUM* COLLAGENASE

A.S. SARGSYAN^{1,2*}, B.G. BABAYAN², N.S. AVETISYAN^{1,2},
A. G. MKRTCHYAN¹, A.M. HOVHANNISYAN^{1*}, N.A. HOVHANNISYAN^{1,2}

¹ Chair of Pharmtechnology and Pharmacy Economics and Managements, YSU,

² SPC "Armbiotechnology" NAS RA

armenssargsyan@gmail.com

anhovhannisyany@ysu.am

Optically active non-protein α -amino acids have been screened for their ability to interact with collagenase of *Clostridium histolyticum*. Both structure-based drug design approach (modeling) and that of determining enzyme activity in the presence of amino acids have been used to identify low molecular weight inhibitors of collagenase. According to the docking analysis, a number of non-protein amino acids have demonstrated ability to form bounds with collagenase. Following the docking analysis, enzyme activity has been determined in the presence of investigated amino acids. The results have indicated that (S)- β -[4-allyl-3-butyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine, (S)- β -[4-allyl-3-(pyridin-4'-yl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine and (S)- β -[4-allyl-3-(pyridin-3'-yl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine inhibit collagenase activity.

Non-protein amino acid – docking – collagenase – inhibitor

Իրականացվել է *Clostridium histolyticum*-ից անջատված կոլագենազի հետ սիլսթետիկ ամինաթթուների փոխազդեցության հատկությունների սերինինգ: Կոլագենազի ցածրամոլեկուլային արգելակիչների հայտնաբերման նպատակով կիրառվել է երկու մոտեցում՝ մոդելավորման եղանակով դեղերի կառուցում և ամինաթթուների առկայությամբ ֆերմենտային ակտիվության որոշում: Դոքինգ հետազոտության արդյունքների համաձայն մի շարք ամինաթթուներ կոլագենազի հետ կապվելու հատկություն են ցուցաբերել: Այնուհետև չափվել է ֆերմենտի ակտիվությունը՝ հետազոտվող ամինաթթուների առկայության պայմաններում: Արդյունքները ցույց են տվել, որ (S)- β -[4-ալիլ-3-բուտիլ-5-թիոքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանինը, (S)- β -[4-ալիլ-3-(պիրիդին-4'-իլ)-5-թիոքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանինը և (S)- β -[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիոքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանինը հանդիսանում են կոլագենազի արգելակիչներ:

Ոչ սպիտակուցային ամինաթթու – դոքինգ – կոլագենազ – արգելակիչ

Осуществлен скрининг синтетических аминокислот на способность взаимодействовать с коллагеназой, выделенной из *Clostridium histolyticum*. Для выявления низкомолекулярных ингибиторов коллагеназы были использованы два подхода: конструирование лекарств на основе структуры путем моделирования и определение активности фермента в присутствии аминокислот. Согласно данным докинга анализа ряд небелковых аминокислот проявили способность связываться с коллагеназой. Далее определялась активность фермента в присутствии исследуемых аминокислот. Результаты показали, что (S)- β -[4-аллил-3-бутил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин, (S)- β -[4-аллил-3-(пиридин-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин и (S)- β -[4-аллил-3-(пиридин-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин являются ингибиторами коллагеназы.

Небелковая аминокислота – докинг – коллагеназа – ингибитор

Non-protein α -amino acids occupy a special place among optically active compounds having biological activity. The biological activity of these compounds is stipulated by their ability to interact with enzymes. Design of a number of modern antibacterial, antiviral, antitumor and other drugs, as well as food supplements is based on the property of non-protein amino acids and peptides either to inhibit or enhance the activity of relevant target enzymes [1, 2].

Matrix metalloproteases (MMPs) are a major group of enzymes that regulates cell-matrix composition. MMPs play an important role in degradation of extracellular matrix in both norm and various pathologies [3]. Due to their active participation in various physiological processes MMPs are suggested as targets for a wide range of medications, including antitumor and anti-inflammatory drugs [4, 5]. MMPs are responsible for many proteolytic processes that lead to tumor development. Involvement of gelatinases (MMP-9 and MMP-2) in the process of metastases and angiogenesis formation stimulated creation of synthetic gelatinase inhibitors able to stop the development of tumors [6]. The majority of MMPs inhibitors are zinc-chelating compounds of a wide spectrum of action that do not have a specific effect. The search for new highly specific compounds able to inhibit MMPs is one of the directions in creation of drugs preventing spread of metastases [7]. Recently some low molecular weight compounds have been described as effective MMPs inhibitors [8].

In this work the screening of heterocycle substituted non-protein amino acids as *Clostridium histolyticum* collagenase (MMP-1) inhibitors has been carried out. This metalloprotease has a high level of homology with mammals collagenases [9]. The structure-based drug design approach was used to identify small inhibitors of enzyme. Enzyme activity in the presence of investigated compounds was determined as well. Some of the investigated non-protein α -amino acids were characterized as *Clostridium histolyticum* collagenase inhibitors.

Materials and methods. The heterocyclic substituted non-nprotein amino acids studied in this work were synthesized at Scientific and Production Center “Armbiotechnology” NAS RA and the Institute of Pharmacy of Yerevan State University [10]. Collagenase from *Clostridium histolyticum* (EC 3.4.24.3), and miscellaneous reagents were purchased from Sigma (USA).

Collagenase activity. The screening of investigated compounds on the ability to influence enzyme activity was carried by using 0.6% agarose gel containing 5 mg/ml gelatin and 0.05 M HEPES buffer, pH 7.2. The mixture of CaCl_2 activated collagenase and amino acid was placed on agarose surface and incubated at 37°C. The diameter of cleared spots was measured after 2-3 hours.

Collagenase activity was determined by measuring free amino groups according to o-phthalaldehyde (OPA) method [11]. The reaction mixture contained 0.05 M HEPES buffer, pH 7.2, 10 mg/ml gelatin and 0.025 mg/ml collagenase (activated by 0.36 M CaCl_2).

Modeling. Modeling was done according to the procedure described previously [12]. Docking of ligand to enzyme was done by AutoGrid 4, AutoDock Vina software [13]. Crystallographic structures of collagenase were taken from <http://www.rcsb.org> website (PDB-ID: 1NQD, 1NQJ). The both structures of collagen-binding domain with (1NQD) and without Ca^{2+} ions (1NQJ) were considered.

Results and Discussion. *Selection of collagenase inhibitors by docking analysis (modeling).* The interaction of collagenase with 50 nonprotein amino acids was investigated by using AutoGrid 4, AutoDock Vina software aimed to select enzyme inhibitors. ΔG and K_i values were calculated. Based on values of ΔG (free energy of binding) the compounds were selected which are able to make complexes with enzyme. Comparing the results of docking analysis on two models it was found out that Ca^{++} free 1NQJ collagenase model formed stronger complexes with amino acids compared with Ca^{++} 1NQD. In this work both results were considered. It should be mentioned that as

the most suitable molecules which are able to make complexes with enzyme we consider those for which values of ΔG are <-5.5 ($K_I < 0.093\text{mM}$) determined by docking analysis on 1NQD model, and ΔG are <-6.2 ($K_I < 0.025\text{mM}$) determined by docking analysis on 1NQJ model (tab. 1). Moreover, attention was paid (in terms of inhibition) to molecules, which bind enzyme not at the active center. The number, position and length of hydrogen bonds in protease-inhibitor complexes were calculated (data not shown).

Calculation results suggest that the hydrogen bonds play the main role in this interaction. According to the calculated values of ΔG (K_I) collagenase forms the most stable complexes with compounds presented in tab. 1. These synthetic amino acids bind collagenase at sites, which are not involved in the active center of enzyme.

Table 1. Interaction of non-protein amino acids with collagenase

Non-protein amino acids	1NQD model		1NQJ model	
	ΔG (kcal/mol)	K_I (μM)	ΔG (kcal/mol)	K_I (μM)
S)- β -[4-phenyl-3-(3'-hydroxypropyl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine	-5.6	0.07855	-7.3	0.00446
S)- β -[4-phenyl-3-propyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine	-5.5	0.09299	-6.9	0.00875
S)- β -[4-allyl-3-benzyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine	-6.2	0.02853	-7.1	0.00625
S)- β -[4-allyl-3-(furan-2-yl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine	-5.8	0.05605	-6.6	0.01453
S)- β -[4-allyl-3-(2'-chlorophenyl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine	-6.4	0.02036	-7.6	0.00269
S)- β -[4-(furan-2-yl-methyl)-3-butyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine	-6.1	0.03378	-6.3	0.0241
S)- β -[4-methyl-allyl-3-butyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine	-5.9	0.04734	-6.5	0.0172
S)- β -[4-allyl-3-butyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine	-6.0	0.03999	-6.3	0.0241
S)- β -[4-allyl-3-(pyridin-4'-yl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine	-5.6	0.07855	-6.3	0.0241
S)- β -[4-allyl-3-(pyridin-3'-yl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine	-5.6	0.07855	-7.0	0.00739

The effect of non-protein amino acids on the activity of collagenase. The preliminary screening of amino acids listed in tab. 1 on the ability to influence collagenase activity was carried out on agarose gel containing gelatin, as described in section *Materials and methods*. The results revealed three non-protein amino acids, which inhibited collagenase activity: (S)- β -[4-allyl-3-butyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine, (S)- β -[4-allyl-3-(pyridin-4'-yl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine and (S)- β -[4-allyl-3-(pyridin-3'-yl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine. Then the activity of collagenase was determined in the presence of these non-protein amino acids. According to obtained results collagenase was inhibited by (S)- β -[4-allyl-3-butyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine, (S)- β -[4-allyl-3-(pyridin-4'-yl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine and (S)- β -[4-allyl-3-(pyridin-3'-yl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine. The results are presented in Table 2. The rest of investigated compounds had no influence on enzyme activity.

According to the data obtained some amino acids despite their ability to interact with collagenase do not have influence on enzyme activity. Only (S)- β -[4-allyl-3-butyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine, (S)- β -[4-allyl-3-(pyridin-4'-yl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine and (S)- β -[4-allyl-3-(pyridin-3'-yl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine have demonstrated inhibition effect on collagenase. Thus the results indicate that inhibition of collagenase depends not only on ability to interact with enzyme, but also on the structure of amino acid molecule. Amino acids that inhibited collagenase have distinct substituted moieties such as -3-butyl, 3-(pyridin-4'-yl) and -3-(pyridin-3'-yl).

Table 2. Inhibition effect of nonprotein amino acids on collagenase activity

Non-protein amino acids	ΔG (kcal/mol)	KI (μM)	IC50 (μM)
(S)- β -[4-allyl-3-butyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine	-6,3	0,0241	2,67
(S)- β -[4-allyl-3-(pyridin-4'-yl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine	-6,3	0,0241	2,1
(S)- β -[4-allyl-3-(pyridin-3'-yl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine	-7	0,00739	2,2
(S)- β -[4-phenyl-3-(3'-hydroxypropyl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine	-5,6	0.07855	-
(S)- β -[4-phenyl-3-propyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine	-5,5	0.09299	-
(S)- β -[4-allyl-3-benzyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine	-6,2	0.02853	-
(S)- β -[4-allyl-3-(furan-2-yl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine	-5,8	0.05605	-
(S)- β -[4-allyl-3-(2'-chlorophenyl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine	-6,4	0.02036	-
(S)- β -[4-(furan-2-yl-methyl)-3-butyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine	-6,1	0.03378	-
(S)- β -[4-methyl-allyl-3-butyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine	-5,9	0.04734	-

This work was supported by the RA MES State Committee of Science, (the project № 15T-1F241), ISTC PROJECT №2289.

REFERENCES

1. Goulet M.T. Synthesis and structure—activity relations of thieno-[2,3 a]-pyridine-2,4-dione derivatives as potent GnRH receptor antagonists. *Annu. Rep. Med. Chem.*, 30, 169-177, 1995.
2. Van Der Baan J., Barnik J., Bickelhaupt F. Antibiotic A 19009. Structural investigation and synthesis. *Antibiotics*, 36, 784-790, 1983.
3. Close D.R. Matrix metalloproteinase inhibitors in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 60 Suppl. 3:iii62-7, 2001.
4. Migliaccio A., Castoria G., Giovannelli P., Auricchio F. Cross talk between epidermal growth factor (EGF) receptor and extra nuclear steroid receptors in cell lines. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 327, 1-2, 19-24, .2010.
5. McCawley L.J., Matrisian L.M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 13, 534-540, 2001.
6. Krüger A., Arlt M.J., Gerg M., Kopitz C., Bernardo M.M., Chang M., Mobashery S., Fridman R. Antimetastatic activity of a novel mechanism-based gelatinase inhibitor. *Cancer Res.*, 65, 9, 3523-6, 2005.
7. Hsieh M.J., Chen J.C., Yang W.E., Chien S.Y., Chen M.K., Lo Y.S., His Y.T., Chuang Y.C., Lin C.C., Yang S.F. Dehydroandrographolide inhibits oral cancer cell migration and invasion through NF- κ B-, AP-1-, and SP-1-modulated matrix metalloproteinase-2 inhibition. *Biochem Pharmacol.*, 17, 2952, 30041-2, 2017.
8. Bannikov G.A., Lakritz J., Premanandan C., Mattoon J.S., Abrahamsen E.J. Kinetics of inhibition of purified bovine neutrophil matrix metalloproteinase 9 by low-molecular-weight inhibitors. *Am. J. Vet. Res.* 70, 5, 633-9, 2009.
9. Edkins T.J., Koller-Eichhorn R., Alhadeff J.A., Mayer U., Faust H., Del Tito B.J. Assessment of potential cross-reactivity of human endogenous matrix metalloproteinases with collagenase *Clostridium histolyticum* antibodies in human sera obtained from patients with Dupuytren's contracture. *Clin Vaccine Immunol.*, 19, 4, 562-9, 2012.
10. Ashot S. Saghyan, Peter Langer. Asymmetric synthesis of non-proteinogenic amino acids. John Wiley and Sons Ltd., UK, 2016.
11. Gade W., Brown J. Purification, characterization and possible function of alpha-N-acylamino acid hydrolase from bovine liver. *Biochemica and Biophysica Acta*, 13, 86-93, 1981.
12. Hovhannisyanyan N., Harutyunyan Sh., Hovhannisyanyan A., Hambarzumyan A., Chitchyan M., Melkumyan M., Oganezova G., Avetisyan N. The novel inhibitors of serine proteases. *Amino Acids.*, 37, 3, 531-6, 2009.
13. Trott O., Olson A.J. Software News and Update AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.*, 31, 455-461, 2010.

Received on 10.11.2017



IN VIVO ACTION OF CISPLATIN ON LIPID CONTENT IN NUCLEAR MEMBRANES FROM RAT BRAIN CELLS

E.S. GEVORGYAN, ZH.V. YAVROYAN, N.R. HAKOBYAN,
A.G. HOVHANNISYAN, E.G. SARGSYAN

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

The *in vivo* action of antitumor drug cisplatin on content of phospholipids and neutral lipids in nuclear membrane fraction from rat brain cells has been investigated. It was shown, that the drug action leads to decrease in total phospholipids and neutral lipids content by about 27.5% and 25% respectively. In spite of these significant changes of total lipids the alterations in relative percentage content of individual phospholipids as well as neutral lipids in nuclear membrane preparations were negligible. These results indicate that cisplatin excites universal changes in lipid metabolism in nuclear membranes appreciably reducing the absolute quantities almost of all individual phospholipid and neutral lipid fractions available in nuclear membranes preparations. The significance of these quantitative changes in development of cisplatin antitumor effects was discussed.

Cisplatin – nuclear membrane – phospholipids – neutral lipids

Չետազոտվել է ֆոսֆոլիպիդների և չեզոք լիպիդների բանալը առնետի ուղեղի բջիջներից ստացված կորիզային թաղանթի ֆրակցիայում հակաուռուցքային դեղամիջոց ցիսպլատինի *in vivo* ազդեցությունը: Ցույց է տրվել, որ ցիսպլատինի ազդեցությունը նվազեցնում է ընդհանուր ֆոսֆոլիպիդների և չեզոք լիպիդների բանալը, համապատասխանաբար 27,5 % և 25 %-ով: Չնայած ընդհանուր լիպիդների այդ զգալի փոփոխություններին, առանձին ֆոսֆոլիպիդների, ինչպես նաև չեզոք լիպիդների հարաբերական տոկոսային պարունակության փոփոխությունները կորիզային թաղանթի պատրաստուկներում չնչին են: Նշված արդյունքները ցույց են տալիս, որ ցիսպլատինը կորիզային թաղանթում առաջացնում է նմանատիպ փոփոխություններ, զգալիորեն նվազեցնելով համարյա բոլոր առանձին ֆոսֆոլիպիդների և չեզոք լիպիդների ֆրակցիաների բացարձակ բանալները: Զննարկվում է այդ բանալական փոփոխությունների նշանակությունը ցիսպլատինի հակաուռուցքային ազդեցությունների դրսևորման հարցում:

Ցիսպլատին – կորիզային թաղանթ – ֆոսֆոլիպիդներ – չեզոք լիպիդներ

Исследовалось *in vivo* воздействие противоопухолевого препарата цисплатина на содержание фосфолипидов и нейтральных липидов во фракциях препаратов ядерной мембраны из клеток мозга крыс. Показано, что воздействие препарата приводит к уменьшению содержания тотальных фосфолипидов и нейтральных липидов соответственно на 27,5 % и 25 %. Несмотря на эти значительные изменения тотальных липидов, изменения в относительном процентном содержании отдельных фосфолипидов, также как и нейтральных липидов в препаратах ядерной мембраны, незначительны. Данные результаты показывают, что цисплатин приводит к одностипным изменениям в метаболизме липидов, значительно уменьшая абсолютные значения почти во всех фракциях отдельных фосфолипидов и нейтральных липидов в препаратах ядерной мембраны. Обсуждается значение данных количественных изменений в проявлении противоопухолевых эффектов цисплатина.

Цисплатин – ядерная мембрана – фосфолипиды – нейтральные липиды

It is well known that cisplatin (cis-diaminedichloroplatinum II) is an effective antitumor drug which is widely used in chemotherapeutic practice and reveals antineoplastic, cytotoxic, immune-modulator actions and induction of apoptotic pathways of the cell [7, 9, 11]. Cisplatin can overpass the hematoencephalic barrier and accumulate in neural cells after the first injection. The efficiency of this drug is dose-dependent though its usage in higher concentrations is contraindicated because of diverse negative side effects, such as nephrotoxicity, ototoxicity, neurotoxicity and others [8, 12, 13, 20]. Peripheral neurotoxicity is one of the widespread side effects which develop in approximately 30-50 % of patients receiving cisplatin [3, 13]. The mechanism of neurotoxicity caused by cisplatin administration is unclear though it is obvious that the drug generates reactive oxygen species which interact with DNA, lipids and proteins. These interactions lead to lipid peroxidation, DNA molecule damages and eventually cell death [3, 13]. Taking into consideration that the cell nuclei is the main target for cisplatin action one may suppose the involvement of metabolic changes of nuclear lipids in manifestation of neurotoxicity. It is obvious that the large majority of nuclear lipids is available in nuclear membranes which plays significant role in nuclear functions of vital importance [1, 2]. Cisplatin may have an effect on lipid metabolism of nuclear membranes, even if on functioning of signal transduction pathways via the quantitative and qualitative alterations in their lipid content. So, the knowledge about the alterations in content of nuclear membrane lipids (phospholipids and neutral lipids) after *in vivo* action of cisplatin may contribute to better understanding antitumor action effects of this drug.

Materials and methods. The experiments were carried out on albino rats (120-150 g weight). Cisplatin was injected peritoneal in concentration of 5 mg per 1000g animal weight. Rats were decapitated after 24 hours of cisplatin injection. Rat brain nuclei were isolated by the method of Blobel and Potter [6]. Nuclear membrane preparations were isolated from purified nuclei by the method of Berezney et al [4]. Lipid extraction was carried out by Bligh and Dayer [5]. The fractioning of both phospholipids and neutral lipids was carried out by micro thin layer chromatography (micro TLC) using L silicagel, 6x9 cm² plates with the thickness of layer 5-7 mcm, using chloroform – methanol – water in ratio 65:25:4 (in case of phospholipids) and diethyl ester – petroleum ester – formic acid in ratio 40:10:1 (in case of neutral lipids) as dividing mixtures. After the chromatography the plates were dried up at 20°C and were treated by 15.6 % CuSO₄ in 8 % phosphoric acid (in case of phospholipids) and by 10 % H₂SO₄ (in case of neutral lipids). Then the elaborated plates were heated at 180°C for 15 min. The quantitative estimation of separated and specific lipid phospholipids was carried out by special computer software FUGIFILM Science Lab 2001 Image Gauge V 4.0, which was destined for densitometry. Obtained results were treated by statistics.

Results and Discussion. Cisplatin *in vivo* action reliably decreases the total amounts of both phospholipids and neutral lipids in nuclear membrane preparations from rat brain cells by 27.5 % and 25.0 % correspondingly (tab. 1, fig.1). It is characteristic that of the same kind changes were also demonstrated by us in brain chromatin preparation [14] as well as in nuclear membranes and intranuclear structures of other tissues [14-18]. All these results demonstrate that this antitumor agent leads to appreciable repression of whole lipid metabolism in rat cell nuclei.

Table 1. Total phospholipids and neutral lipids content (mcg/g of tissue) in nuclear membrane preparations of rat brain cells in baseline and after *in vivo* treatment of cisplatin (*-p < 0.05)

Variants	Phospholipids in nuclear membrane from rat brain cells (mcg/g of tissue)	Neutral lipids in nuclear membrane from rat brain cells (mcg/g of tissue)
Baseline	462.00±9.20	300.00±3.15
Cisplatin	*335.00±7.63	*225.00±3.50

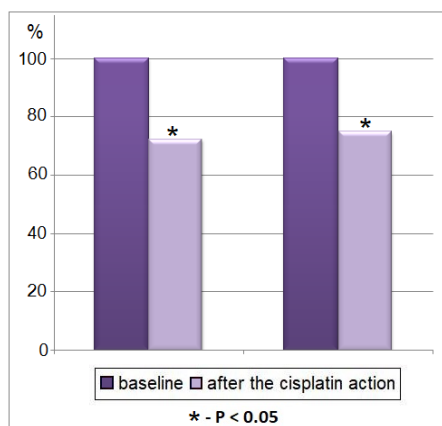


Fig. 1. Changes in percent of total phospholipids (left diagrams) and neutral lipids (right diagrams) content in nuclear membrane preparations of rat brain cells in baseline and after *in vivo* treatment of cisplatin

The fractionation of nuclear membrane phospholipids revealed seven individual fractions in baseline and after the cisplatin action. Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine are the major fractions among them, their portion jointly was near 49 %, while the percentage content other five fractions jointly is a little more than half 51 % (tab. 2). Cisplatin treatment essentially changed the relative content of individual phospholipid fractions: the content of five fractions was increased a little while the content of two of them (phosphatidic acid and cardiolipin) was reliable decreased (tab. 2).

Table 2. The relative content (percentage) of individual phospholipid fractions in nuclear membrane preparations of rat brain cells before and after the cisplatin action

N	Phospholipids	Baseline	Cisplatin
		%	%
1	Phosphatidylserine	10,10±0,59	12,25±0,24
2	Sphingomyelin	13,82±0,70	14,55±0,34
3	Phosphatidylinositol	8,74±0,26	12,05±0,26
4	Phosphatidylcholine	27,50±0,84	28,00±0,57
5	Phosphatidylethanolamine	21,20±1,50	22,00±0,52
6	Cardiolipin	10,44±0,80	5,75±0,24
7	Phosphatidic acid	8,20±0,78	5,40±0,26
Total content		100	100

The fractionation of neutral lipids demonstrated the presence of six individual fractions in baseline as well as after the cisplatin action (tab. 3). As in case of phospholipids, cisplatin treatment lead to diversified changes in relative content of individual neutral lipid fractions. The relative content of two of them (cholesterol and triglycerides) was increased in percentage, for the other two (cholesterol esters and free fatty acids) – was decreased while the relative content of monoglycerides and diglycerides was not reliably changed (tab. 3).

It is obvious that the obtained changes in percentage content do not represent the reality of alteration in real content of both phospholipid and neutral lipid individual fractions after the cisplatin action. In order to clear up this problem the absolute quantities of individual lipids (in micrograms per gram of brain tissue) in nuclear membrane preparations before and after the cisplatin action were determined.

Table 3. The relative content (percentage) of individual neutral lipid fractions in nuclear membrane preparations of rat brain cells before and after the cisplatin action

N	Neutral lipids	Baseline	Cisplatin
		%	%
1	Monoglycerides	12,00±1,26	11,86±1,00
2	Diglycerides	11,20±0,79	11,50±1,67
3	Cholesterol	25,60±1,81	32,60±1,35
4	Cholesterol esters	16,20±1,00	13,60±0,60
5	Free fatty acids	26,00±0,70	18,66±1,70
6	Triglycerides	9,00±1,30	11,78±1,34
Total content		100	100

The absolute quantities of six phospholipid individual fractions were decreased reliably while the phosphatidylinositol quantity was not changed after the *in vivo* action of cisplatin (tab. 4). The most diminution of content among phospholipid fractions was observed in case of cardiolipin and phosphatidic acid by 60,0% and 52,2% correspondingly, which was much more than the decrease of total phospholipid content (27,1%). The decreases of choline-hold phospholipids sphingomyelin and phosphatidylcholine as well as phosphatidylethanolamine content (23-27%) were as big as the decrease of total phospholipids content (tab. 4). In all probability the latter results testify that in brain cell nuclear membranes the cisplatin *in vivo* action has no specific affect concerning the metabolic pathways where those three phospholipids have a share. In spite of that the most notable results were demonstrated in case of phosphatidylinositol which share in phospholipid total amount was reliably increased (by 3,31%) (tab. 2). This indicates that cisplatin probably may affect on functioning of phosphoinositide regulatory circle which is known exists in nuclei and which has been widely described [19, 21]. The absence of alteration of absolute quantity of phosphatidylinositol against the background of diminution of other individual phospholipids content after the cisplatin action may be elucidated by cisplatin ability to affect on phosphoinositide regulatory circle via increasing the monophosphoinositide: triphosphoinositide ratio. At the same time the significant diminution of cardiolipin and phosphatidic acid content boldly confirms the cisplatin influence on phospholipid metabolic pathways in nuclei of brain cells (tab. 4).

Table 4. The quantities (micrograms per gram of tissue) of individual phospholipid fractions in nuclear membrane preparations of rat brain cells before and after the cisplatin action (*p < 0.05)

N	Phospholipids	Baseline	Cisplatin
1	Phosphatidylserine	46,70±1,65	*41,04±0,80
2	Sphingomyelin	63,85±2,00	*48,74±1,07
3	Phosphatidylinositol	40,37±1,80	40,36±0,87
4	Phosphatidylcholine	127,00±3,00	*93,80±1,90
5	Phosphatidylethanolamine	98,00±1,63	*73,70±1,32
6	Cardiolipin	48,23±2,95	*19,26±0,80
7	Phosphatidic acid	37,85±2,00	*18,10±0,87

The similar situation was observed in case of neutral lipids: the absolute quantity of four fractions was reliably decreased in a different extent while diminution of the amounts of triglycerides and cholesterol was not reliable. (tab. 5). These alterations confirm that cisplatin *in vivo* action leads to perceptible redistribution between the mono-, di- and triglycerides as well as between the cholesterol and its esters in brain nuclear membrane (tab. 5).

Table 5. The quantities (micrograms per gram of tissue) of individual neutral lipids fractions in nuclear membrane preparations of rat brain cells before and after the cisplatin action (*p < 0.05)

N	Neutral lipids	Baseline	Cisplatin
1	Monoglycerides	36,00±0,45	*26,70±2,25
2	Diglycerides	33,60±0,27	*25,85±1,94
3	Cholesterol	76,80±2,16	73,35±3,00
4	Cholesterol esters	48,60±3,00	*30,60±1,35
5	Free fatty acids	78,00±2,10	*42,00±1,95
6	Triglycerides	27,00±1,98	26,50±1,74

The obtained results demonstrate their accordance with our previous data concerning the diminution of phospholipids and neutral lipids content in rat brain chromatin [14] as well as in different nuclear structures from rat liver, thymus and kidney cells [14-16, 21]. This indicates the comprehensive action of cisplatin on lipid metabolism in various nuclear structures from different tissues. Although the cisplatin action is specific in different tissues which is clearly seen in manifestations of various negative side effects including nephrotoxicity (as the main negative effect), neurotoxicity, ototoxicity, gastrotoxicity, myelosuppression, allergic reactions etc. The alterations of quantities of nuclear lipids in various rat tissues, on the whole, are similar. In all probability this similarity indicates that cisplatin displays its antitumor effects also via changes of nuclear lipids quantity and these alterations are not directly connected with toxic effects of the drug. So, all these results demonstrate the deep and multiform transformation of lipid metabolism in nuclei caused by cisplatin *in vivo* action.

REFERENCES

1. Albi E., Lazzarini R., Viola Magni M. Phosphatidylcholine/sphingomyelin metabolism crosstalk inside the nucleus. *Biochem.j.*, 410, 381-389, 2008.
2. Albi E., Viola Magni M.P. Chromatin-associated sphingomyelin: metabolism in relation to cell function. *Cell Biochem. Funct.*, 21, 211-215, 2003.
3. Amptoulach S., Tsavaris N. Neurotoxicity caused by the treatment with platinum analogues. *Chemotherapy Res. and Practice*, pp. 1-5, 2011.
4. Berezney R., Funk L.K., Crane F.H. Isolation of nuclear membrane from a large scale preparation of bovine liver nuclei. *BBA*, 203, 3, p.531-546, 1970.
5. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Biochem. Physiol.*, 37, pp. 911-917, 1959.
6. Blobel G., Potter V.R. Nuclei from rat liver: Isolation method that combines purity with high yield. *Science*, 154, 76-79, 1966.
7. Bouliskas T. Molecular mechanisms of cisplatin and its liposomally encapsulated form, lipoplatin. Lipoplatin as a chemotherapy and antiangiogenesis drug. *Cancer Therapy*, 2007, 5, p. 349-376.
8. Crona D.J., Faso A., Nishijima T.F., McGraw K.A., Galsky M.D., Milowsky M.I. A Systematic review of strategies to prevent cisplatin-induced nephrotoxicity. *Oncologist*, 22, 5, 609-619, 2017.
9. Dasari Sh., Tchounwou P.B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J. Pharmacol.*, p. 364-378, 2014.
10. Elouarrat, D., in book "Linking lipids to acetylation" Chapter 3. Nuclear phospholipids as epigenetic regulators, p. 47-61 (127p), 2013.
11. Florea A.M., Busselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: Cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*, 3, p.1351-1371, 2011.

12. Hanigan M. H., Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Therapy*, 1, 47-61, 2003.
13. Hashem R.M., Safwar G.M., Rashed L.A., Bakry S. Biochemical findings on cisplatin-induced oxidative neurotoxicity in rats. *International journal of Advanced Research*, 3, Issue 10, 1222-1234, 2015.
14. Gevorgyan E.S., Yavroyan Zh.V., Hakobyan N.R., Hovhannisyan A.G. Cisplatin in vivo influence of lipid content of chromatin on rat brain cells. *Proceedings of the Yerevan State University*, 51, 1, 21-26, 2017.
15. Gevorgyan E.S., Yavroyan Zh.V., Hovhannisyan A.G., Hakobyan N.R. Action of Cisplatin on Phospholipid Content in Rat Liver and Thymus Chromatin. *Electronic Journal of Natural Sciences*, 19, 2, 3-6, 2012.
16. Gevorgyan E.S., Yavroyan Zh.V., Hovhannisyan A.G., Hakobyan N.R., Sargsyan E.G. Cisplatin in vivo action on lipid content in chromatin from rat kidney cells. *Biolog. Journal of Armenia*, 68, 3, 12-18, 2016.
17. Gevorgyan E.S., Yavroyan Zh.V., Hovhannisyan A.G., Hakobyan N.R., Sargsyan E.G. Cisplatin in vivo action on phospholipid content in rat liver and thymus nuclear membranes. *Elect. J.Nat.Sci.*, 21, 2, pp.14-16, 2013.
18. Gevorgyan E.S., Yavroyan Zh.V., Hovhannisyan A., Hakobyan N.R., Sargsyan E.G. Phospholipid content in rat liver and thymus nuclear matrix under the in vivo action of cisplatin. *Elect. J.Nat.Sci.*, 22, 1, pp. 8-11, 2014.
19. Gevorgyan E.S., Yavroyan Zh.V., Hovhannisyan A.G., Hakobyan N. Changes in polyphosphoinositides content in nuclear membranes of rat liver and thymus cells under the action of cisplatin // *Biolog. Journal of Armenia*, 2014, 2, 66, pp.46-51.
20. Silconi Ž.B., Benazic S., Milovanovic J., Arsenijevic A., Stojanovic B., Milovanovic M., Miller R.P., Tadagavadi R.K., Ramesh G., Reeves W.B., Mechanisms of cisplatin Nephrotoxicity. *Toxins*, 2, 2490-2518, 2010.
21. Struchkov V.A., Strazhevskaya N.B. Structural and functional aspects of nuclear lipids in normal and tumor cells. *Biochemistry (Moscow)*, 65, 5, 620-643, 2000.

Received on 28.08.2017



Biolog. Journal of Armenia, 1 (70), 2018

EFFECT OF NON-THERMAL MILLIMETER ELECTROMAGNETIC RADIATION ON THERMODYNAMIC PARAMETERS OF THE BINDING OF LIGANDS WITH NUCLEIC ACIDS

S.N. HAKOBYAN¹, V.P. KALANTARYAN², Y.S. BABAYAN³

¹Department of mechanical engineering, Armenian State University of Engineering,

²Department of Microwave radiophysics and telecommunications, Yerevan State University,

³Department of Physics and Electrotechnics, Yerevan State University of Architecture and Construction

babayanyura@gmail.com

It has been shown that intercalating (mitoxantone, doxorubicin) and non-intercalating (netropsin, Hoechst 33258) ligands form more strong complex with nucleic acids irradiated by resonant frequencies (64,5 and 50.3 GHz) for oscillations of water structures. Under the effect of the mentioned non-thermal millimeter waves a dehydration of nucleotides occurs, which results in increasing of the binding constant of ligands with irradiated double-stranded nucleic acids (NA). Calculations showed that as a result of irradiation, the enthalpy (ΔH) and entropy (ΔS) of the binding of ligands to NA has been changed. However the value of ΔH is mainly being changed for intercalators, and the value of ΔS - for non-intercalators.

DNA – synthetic polyribonucleotide – mitoxantrone – doxorubicin – netropsin – Hoechst 33258

Ցույց է տրվել, որ ինտերկալացվող (միտոքսանտրոն, դոքսորուբիցին) և չինտերկալացվող (նետրոպսին, Hoechst 33258) լիգանդները ջրի կառուցվածքների տատանումների ռեզոնանսային հաճախություններով (64.5 և 50.3 ԳՀց) ճառագայթված նուկլեինաթթուների հետ առաջացնում են ավելի ամուր կոմպլեքս: Նշված ոչ ջերմային միլիմետրային ալիքների ազդեցության ներքո տեղի է ունենում նուկլեոտիդների դեհիդրատացիա, ինչը հանգեցնում է ճառագայթահարված երկշրջա նուկլեինաթթուների (ՆԹ) հետ լիգանդների կապման հաստատունի մեծացմանը: Հաշվարկները ցույց են տվել, որ ճառագայթման արդյունքում փոխվում են ՆԹ-ի հետ լիգանդների կապման էնթալպիան (ΔH) և էնթալպիան (ΔS), սակայն ինտերկալատորների կապման արդյունքում հիմնականում փոխվում է ΔH -ը, իսկ ոչ ինտերկալատորների համար՝ ΔS -ը:

*ՆԹ – սինթետիկ պոլիռիբոնուկլեոտիդ – միտոքսանտրոն – դոքսորուբիցին –
նետրոպսին – Hoechst 33258*

Показано, что интеркалирующие (митоксантрон, доксорубин) и неинтеркалирующие (нетропсин, Hoechst 33258) лиганды с нуклеиновыми кислотами, облученными резонансными частотами (64.5 и 50.3 ГГц) колебаний водных структур, образуют более прочный комплекс. Под действием указанных нетепловых миллиметровых волн происходит дегидратация нуклеотидов, что и приводит к увеличению константы связывания лигандов с облученными двуспиральными нуклеиновыми кислотами (НК). Расчеты показали, что вследствие облучения изменяются энтальпия (ΔH) и энтропия (ΔS) связывания лигандов с НК, однако для интеркалиаторов вследствие связывания в основном меняется ΔH , а для неинтеркалиаторов – ΔS .

*ДНК – синтетический полирибонуклеотид – митоксантрон – доксорубин –
нетропсин – Hoechst 33258*

Numerous physical factors of environment, playing a key role in vital processes of biological systems, have an electromagnetic nature. Electromagnetic waves of the artificial origin and various frequency ranges have a significant effect on the living organisms and possess a wide application [1, 2]. The topics connected to the possible negative impacts of electromagnetic waves on living organisms as well as medico-biological aspects of their application as therapeutic agents are actual directions of contemporary science [3-6]. It was shown in [7-9] that non-thermal millimeter electromagnetic waves (MM EMW) certainly affect the water-saline solutions of DNA in vitro. At the irradiation of DNA solutions by resonant frequencies for oscillations of water molecular structures, MM EMW penetrate deeper in water solutions [7], due to which the thermostability of DNA increases, which in turn is conditioned by dehydration of DNA molecules and Na^+ ions in the solution. It is known that many biologically active compounds (particularly, drugs) penetrating into a cell, bind to nucleic acids (NA) mainly [10, 11]. Taking into consideration that the hydrate layer of NA plays an important role at the complex-formation of biologically active compounds with NA, in this paper the binding of several low-molecular compounds with NA earlier irradiated by MM EMW has been studied.

Materials and methods. Calf thymus DNA, synthetic double-stranded polyribonucleotides poly(A)-poly(U) and poly(G)-poly(C), mitoxantrone (MTX), netropsin (Nt), doxorubicin (DX) and Hoechst 33258 (H33258) were used in experiments. All preparations were purchased from "Sigma" and used without further purification. Measurements were carried out in water solution, containing 0.01M Tris buffer and 0.1 M NaCl, pH 7.4.

Concentration of the preparations was determined using the following extinction coefficients ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{L}$): $\epsilon_{260}(\text{p})=6550$ for calf thymus DNA, $\epsilon_{260}(\text{p})=7140$ for poly(A)-poly(U), $\epsilon_{260}(\text{p})=7900$ for poly(G)-poly(C), $\epsilon_{659}=25090$ for MTX, $\epsilon_{296}=21500$ for Nt, $\epsilon_{480}=11500$ for DX and $\epsilon_{343}=42000$ for H33258.

Spectrophotometric titration was carried out using PYE Unicam SP-8-100 spectrophotometer (England). Measurements were carried out in thermostating cells using quartz cuvettes with hermetically closing caps. For spectrophotometric titration the concentration of MTX was approximately equal to $C_0 \approx 3 \cdot 10^{-6}$ M; $C_0 \approx 7 \cdot 10^{-5}$ M for DX; $C_0 \approx 2 \cdot 10^{-5}$ M for Nt; $C_0 \approx 3 \cdot 10^{-5}$ M for H33258. It was shown that at the mentioned concentrations the self-arbitrary associates of the ligand molecules can be neglected [12,13].

For the irradiation of the solutions G4-141 and G4-142 generators were used. Irradiation was carried out in the glassy dishes. Solutions were covered by transparent for irradiation thin chloride-vinilic layer as described in details [7, 13].

Results and Discussion. It was shown [7, 9] that under the effect of MM EMW the density of DNA water-saline solutions and DNA thermostability increase, though the change is the biggest at the irradiation with 90 min duration and 64.5 and 50.3 GHz frequencies that coincide with resonant ones of oscillations of water structures. That is why the binding of ligands with NA previously irradiated by resonant (64.5 and 50.3 GHz) and non-resonant (48.3 GHz) frequencies and 90 min duration was studied.

Interaction of ligands with NA is reflected in alteration of the absorption spectra in visible and UV regions of the spectrum. The interaction of ligands with NA via the absorption spectra change character in visible (for MTX and DX) and distant UV (for Nt and H33258) regions at the complex-formation was studied. NA do not absorb in distant UV ($\lambda > 320$ nm) and visible regions that is why (at complex-formation of NA-ligand) the character of ligand binding to NA can be studied by the absorption spectra change in the mentioned regions and the binding thermodynamic parameters can be determined.

The absorption spectra of non-irradiated and irradiated calf thymus DNA and polyribonucleotides were obtained at some concentrations of ligands. Experiments show

that the absorption spectra of the complexes and the character of their alteration at titration are almost similar for non-irradiated and irradiated NA. From the absorption spectra the concentration of free and bound ligand in the solution was determined and the binding isotherms in Scatchard's coordinates by the early described method were constructed [12, 13]. The binding isotherms were described by non-linear formula, provided by McGhee and von-Hippel [14], which more precisely describes the adsorption of ligands on NA. It was shown [12,13,15] that in the studying conditions MTX and DX interact with non-irradiated and irradiated NA by one intercalating mode; Nt and H33258 interact with NA by non-intercalating mode, localizing in the minor groove of NA and forming the ordered complex. It should be mentioned that the double-stranded polyribonucleotides poly(A)·poly(U) and poly(G)·poly(C) are in A-form at approximate physiological conditions [16]; the double helix parameters, hydration of nucleotides and charge density along the chain strongly differ from those of DNA in analogous conditions (B-form).

Table 1. Values of the binding constant (K) and saturation stoichiometry (n) determined for the complexes of ligands with non-irradiated and irradiated NA

Ligand type	T, K	Non-irradiated	Irradiated, frequency			n
			50.3 GHz	64.5 GHz	48.3 GHz	
		Binding constant, M ⁻¹				
DNA						
MTX	298.15	(5.1±0.1)·10 ⁵	(10.0±0.2)·10 ⁵	(8.7±0.2)·10 ⁵	(5.2±0.1)·10 ⁵	2.4±0.2
	303.15	(4.1±0.1)·10 ⁵	(7.5±0.1)·10 ⁵	(6.9±0.3)·10 ⁵	(4.2±0.2)·10 ⁵	2.5±0.2
	308.15	(3.35±0.05)·10 ⁵	(5.1±0.2)·10 ⁵	(4.8±0.2)·10 ⁵	(3.4±0.1)·10 ⁵	2.3±0.2
DX	290.15	(6.2±0.1)·10 ⁵	(64.5±0.2)·10 ⁵	(62.0±0.2)·10 ⁵	(6.9±0.1)·10 ⁵	4.0±0.1
	300.15	(5.1±0.1)·10 ⁵	(50.2±0.2)·10 ⁵	(48.1±0.2)·10 ⁵	(5.9±0.1)·10 ⁵	4.1±0.2
	310.15	(4.5±0.2)·10 ⁵	(39.4±0.2)·10 ⁵	(38.2±0.1)·10 ⁵	(5.1±0.1)·10 ⁵	4.0±0.1
Nt	293.15	(5.0±0.2)·10 ⁸	(36.1±0.3)·10 ⁸	(38.4±0.2)·10 ⁸	(6.9±0.2)·10 ⁸	5.9±0.2
	303.15	(3.0±0.1)·10 ⁸	(21.1±0.2)·10 ⁸	(22.3±0.3)·10 ⁸	(4.1±0.2)·10 ⁸	6.0±0.2
	313.15	(1.9±0.2)·10 ⁸	(12.8±0.2)·10 ⁸	(13.0±0.2)·10 ⁸	(4.1±0.2)·10 ⁸	6.0±0.2
H33258	298.15	(5.5±0.5)·10 ⁷	(23.1±0.5)·10 ⁷	(24.2±0.4)·10 ⁷	(6.1±0.5)·10 ⁷	6.0±0.1
	303.15	(8.5±0.5)·10 ⁷	(40.3±0.4)·10 ⁷	(50.5±0.5)·10 ⁷	(9.2±0.3)·10 ⁷	6.0±0.2
	308.15	(10.5±0.2)·10 ⁷	(72.1±0.5)·10 ⁷	(81.7±0.5)·10 ⁷	(12.8±0.5)·10 ⁷	6.0±0.2
poly(G)·poly(C)						
MTX	308.15	(9.5±0.3)·10 ⁴	(1.8±0.1)·10 ⁵	(2.1±0.1)·10 ⁵	(9.6±0.4)·10 ⁴	6.0±0.3
	323.15	(5.7±0.2)·10 ⁴	(1.1±0.1)·10 ⁵	(1.25±0.1)·10 ⁵	(5.9±0.3)·10 ⁴	5.8±0.4
	333.15	(4.2±0.2)·10 ⁴	(0.75±0.08)·10 ⁵	(0.81±0.1)·10 ⁵	(4.2±0.3)·10 ⁴	5.9±0.3
DX	290.15	(4.4±0.1)·10 ⁵	(9.3±0.2)·10 ⁵	(8.8±0.2)·10 ⁵	(4.9±0.1)·10 ⁵	6.0±0.2
	300.15	(2.2±0.1)·10 ⁵	(4.8±0.2)·10 ⁵	(3.3±0.1)·10 ⁵	(2.3±0.1)·10 ⁵	5.9±0.2
	310.15	(1.7±0.1)·10 ⁵	(3.4±0.1)·10 ⁵	(2.8±0.1)·10 ⁵	(1.8±0.2)·10 ⁵	6.0±0.1
poly(A)·poly(U)						
Nt	293.15	(1.2±0.02)·10 ⁸	(3.9±0.1)·10 ⁸	(4.2±0.1)·10 ⁸	(1.71±0.1)·10 ⁸	8.0±0.2
	303.15	(0.72±0.03)·10 ⁸	(2.3±0.1)·10 ⁸	(2.5±0.1)·10 ⁸	(1.02±0.1)·10 ⁸	8.1±0.2
	313.15	(0.44±0.02)·10 ⁸	(1.4±0.1)·10 ⁸	(1.5±0.2)·10 ⁸	(0.63±0.1)·10 ⁸	8.0±0.2
H33258	298.15	(2.1±0.3)·10 ⁷	(11.0±0.4)·10 ⁷	(11.3±0.5)·10 ⁷	(2.8±0.3)·10 ⁷	6.2±0.2
	303.15	(3.3±0.4)·10 ⁷	(15.2±0.5)·10 ⁷	(16.8±0.4)·10 ⁷	(3.4±0.2)·10 ⁷	6.5±0.2
	308.15	(5.0±0.5)·10 ⁷	(23.1±0.5)·10 ⁷	(23.0±0.5)·10 ⁷	(4.9±0.4)·10 ⁷	7.1±0.2

Calculations show that the studied ligands with more hydrated B-form form more solid complex, than with less hydrated A-form (tabl. 1). It should be mentioned that the value of the binding parameters (binding constant (K) and parameter n which characterizes a stoichiometry of NA-ligand complex at the saturation and is equal to number of base pairs occupied by one bound ligand molecule) correlate with the data for

the binding of ligands with DNA obtained by the other authors [17, 18]. The value of the binding constant of the ligands (DX and Nt) with polynucleotide in A-form is almost an order higher at the irradiation of the latter by resonant frequencies of water structures – 64.5 and 50.3 GHz; in the case of MTX and H33258 it is higher several times, while at binding to A-form it is higher several times as well (tabl. 1). At the irradiation of the solutions of DNA and polyribonucleotides by non-resonant frequency (for example, 48.3 GHz), the thermodynamic parameters, characterizing the complex-formation of double-stranded NA with ligands in the error frameworks are unchangeable [tabl. 1 and 2]. In the work [7] at the explanation of the obtained experimental data it was assumed that at the irradiation by resonant frequencies for water structures, the hydration of both Na^+ ions existing in the solution and base pairs of double-stranded DNA decreases. Consequently, it is probable that at the irradiation of NA by 50.3 and 64.5 GHz the stronger dehydration in more hydrated B-form (DNA) occurs due to which the binding of ligands with NA becomes possible to be more solid, which in turn leads to the enhancement of the binding constant at unchanged n.

Table 2. Thermodynamic parameters of the binding of ligands with non-irradiated and irradiated double-stranded nucleic acids

Thermodynamic parameter	Non-irradiated	Irradiated, frequency (GHz)		
		50.3	64.5	48.3
DNA-mitoxantrone				
-ΔG, kcal/mol	7.8	8.0	8.1	7.8
-ΔH, kcal/mol	7.6	8.4	8.5	7.7
ΔS, cal/mol·K	0.8	1.2	1.4	1.2
poly(G)-poly(C)-mitoxantrone				
-ΔG, kcal/mol	7.1	7.5	7.6	7.1
-ΔH, kcal/mol	6.7	7.3	7.4	6.8
ΔS, cal/mol·K	1.3	2.2	2.1	1.2
DNA-doxorubicin				
-ΔG, kcal/mol	7.8	11.3	10.8	7.9
-ΔH, kcal/mol	2.8	4.3	4.1	2.9
ΔS, cal/mol·K	16.6	20.0	18.3	16.7
poly(G)-poly(C)-doxorubicin				
-ΔG, kcal/mol	7.7	6.9	7.7	7.7
-ΔH, kcal/mol	2.6	2.7	2.8	2.6
ΔS, cal/mol·K	15.1	15.3	15.2	15.1
DNA-netropsin				
-ΔG, kcal/mol	11.8	12.9	13.0	11.9
-ΔH, kcal/mol	9.1	9.5	9.6	9.2
ΔS, cal/mol·K	8.6	11.2	11.2	8.9
poly(A)-poly(U)-netropsin				
-ΔG, kcal/mol	10.9	11.6	11.6	11.1
-ΔH, kcal/mol	9.1	9.3	9.3	9.1
ΔS, cal/mol·K	5.9	7.6	7.6	6.2
DNA-Hoechst 33258				
-ΔG, kcal/mol	11.0	11.5	11.5	11.1
ΔH, kcal/mol	6.0	6.5	6.4	5.9
ΔS, cal/mol·K	56	61	63	58
poly(A)-poly(U)-Hoechst 33258				
-ΔG, kcal/mol	10.5	11.0	11.1	10.2
ΔH, kcal/mol	8.5	9.2	9.3	8.6
ΔS, cal/mol·K	62	71	72	64

7

Thermodynamic parameters of the binding: changes in Gibbs free energy (ΔG), enthalpy (ΔH) and entropy (ΔS) were determined from analysis of Want-Hoff dependence of K on temperature. For this aim the adsorption isotherms were obtained at three temperatures, where it becomes known from the melting curves of NA-ligand complexes that NA is in double-stranded state. For non-irradiated and irradiated complexes the dependence of $\ln K$ on $1/T$ was constructed. In each plot through three experimental points a direct line was passed using the least square method and from this curve the values of ΔH and ΔS were determined [12, 13]. Values of the binding thermodynamic parameters for the investigating systems are presented in tabl. 2.

As it follows from tabl. 2, at complex-formation of intercalating and non-intercalating ligands with double-stranded NA irradiated by resonant frequencies, the enhancement of absolute value of the thermodynamic parameters of the binding (ΔG , ΔH and ΔS) is observed as compared to non-irradiated complexes: the ligands form stronger complex with irradiated NA. Despite the fact that at the binding to irradiated NA the absolute values of ΔH and ΔS are being increased, the value of ΔH is mainly being changed for intercalators (MTX and DX), and the value of ΔS - for non-intercalators.

The obtained results indicate the perspective of elaboration of new optimal regimes of the application of anti-tumorous preparations in combination with millimeter waves.

REFERENCES

1. *Makar V.R., Logani M.K., Bhanashali A., Kataoka M., Ziskin M.C.* Effect of millimeter waves on natural killer cell activation. *Bioelectromagnetics*, 26, 1, p. 10-19, 2005.
2. *Tekitskaya E.E., Baryshev M.G., Ilchenko G.P.* Effect of low-frequency electromagnetic field on chemiluminescence water solutions of DNA. *Biophysics*, 60, 6, p. 1099-1103, 2015.
3. *Betskii O.V., Savelev S.V., Morozova L.A.* Millimeter and terahertz waves in solution of pharmacological agents of biological origin. *Biomedical Radioelectronics*, 4, p. 42-46, 2017.
4. *Moiseev V.N., Konstantinov I.V., Levikina I.G.* Results of heart ischemic disease patient curing by electromagnetic radiation in millimeter range. *Millimeter waves in Medicine*, 1, p. 48-51, 1991.
5. *Logani M.K., Szabo I., Makar V.R., Bhanushali A., Alekseev S.I., Ziskin M.C.* Effect of millimeter wave irradiation on tumor metastasis. *Bioelectromagnetics*, 27, p. 258-264, 2007.
6. *Gapeyev A.B., Mikhailik E.N., Chemers N.K.* Anti-inflammatory effects of low-intensity extremely high-frequency electromagnetic radiation: Frequency and power dependence. *Bioelectromagnetics*, 29, p. 197-206, 2008.
7. *Kalantaryan V.P., Hakobyan S.N., Babayan Y.S.* Influence of millimeter wave electromagnetic radiation of nonthermal intensity on density of aqueous solutions. *J. Contemporary Physics*, 52, 11, p. 52-62, 2017.
8. *Kalantaryan V.P., Babayan Y.S., Gevorgyan E.S., Hakobyan S.N., Vardevanyan P.O.* Influence of low intensity coherent electromagnetic millimeter radiation (EMR) on aqua solution of DNA. *Prog. Electromag. Res. Letters*, 13, p. 1-9, 2010.
9. *Hakobyan S.N., Shahinyan M.A., Babayan Y.S.* Stability of irradiated DNA complexes from sarcoma 45 tumors with mitoxantrone at small fillings. *Biophys. Reviews and Letters*, 11, 4, p. 139-147, 2016.
10. *Aleksic M.M., Kapetanovic V.* An overview of the optical and electrochemical methods for detection of DNA-drug interaction. *Acta Chem. Slov.*, 61, p. 555-573, 2014.
11. *Karwin S.M.* G-quadruplex DNA as a target for drug design. *Current Pharmac. Design*, 6, 4, p. 441-471, 2000.
12. *Babayan Y.S., Hakobyan S.N., Ghazaryan R.S., Shahinyan M.A.* Interaction of antitumor agent mitoxantrone with double helical synthetic polyribonucleotides poly(G)-poly(C) and poly(I)-poly(C). *Biophys. Review and Letters*, 12, 4, p. 165-176, 2017.

13. *Kalantaryan V., Hakobyan S., Ghazaryan R. Martirosyan R.* Interaction of antitumor drug doxorubicin with tumor DNA irradiated by nonionizing millimeter electromagnetic waves. *Amer. J. Med. Biol. Res.*, 4, 4, p. 73-77, 2016.
14. *McGhee J.D., von Hippel P.H.* Theoretical aspects of DNA-protein interactions: Co-operative and non co-operative binding of large ligands to one dimension homogeneous lattices. *J. Mol. Biol.*, 86, 3, p. 469-489, 1974.
15. *Babayan Y.S., Kalantaryan V.P., Hakobyan S.N., Ghazaryan R.S.* Interaction of netropsin with double-stranded nucleic acids irradiated with nonionizing athermal millimeter electromagnetic waves. *Arm. J. Phys.*, 9, 2, p. 167-172, 2016.
16. *Saenger V.* Principles of structural organisation of nucleic acids. M., Mir, 584 p., 1987.
17. *Hag I.* Thermodynamics of drug-DNA interactions. *Arch. Biochem. Biophys.*, 403, p. 1-15, 2002.
18. *Bhattacharya J., Basu A., Kumar G.S.* Intercalative interaction of the anticancer drug mitoxantrone with double stranded DNA: A calorimetric characterization of the energetics. *J. Chem. Thermodyn.*, 75, p. 45-51, 2014.

Received on 09.11.2017



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1(70), 2018

**ՖՈՍՖՈՐԱԿԱՆ ԵՎ ԿԱԼԻՈՒՄԱԿԱՆ ՊԱՐԱՐՏԱՆՅՈՒԹԵՐԻ ՖՈՆԻ ՎՐԱ
ԱՉՈՏԱԿԱՆ ՊԱՐԱՐՏԱՆՅՈՒԹԻ ԿԻՐԱՌՄԱՆ ԺԱՄԿԵՏՆԵՐԻ
ԱՉԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՇՆԱՆԱԳԱՆ ԳՈՐԵՆԻ ՈՐՈՇ ԶՈՒՑԱՆԻՇՆԵՐԻ ՎՐԱ**

Մ.Յ. ԳԱԼՍՏՅԱՆ, Գ.Գ. ԹՈՒՆՅԱՆ, Գ.Ս. ՍԱՆԹՐՈՍՅԱՆ

Հայաստանի ազգային ագրարային համալսարան
galstyan.merujan@mail.ru

Ներկայացված են 2016-2017 թթ. ընթացքում Կոտայքի մարզի Հրազդանի տարածաշրջանի պայմաններում ֆոսֆորական և կալիումական պարարտանյութերի ֆոնի վրա ազդողական պարարտանյութի կիրառման ժամկետների ազդեցությունն աշնանացան ցորենի տնտեսա-էկոլոգիական ցուցանիշների վրա կատարված ուսումնասիրությունների արդյունքները:

Ստացված արդյունքներն առաջարկվում են ներդնել տարածաշրջանի ֆերմերային տնտեսություններում մշակվող աշնանացան ցորենի ցանքերում:

Ազդողական պարարտանյութ – կիրառման ժամկետ – աշնանացան ցորեն – տնտեսա-էկոլոգիական ցուցանիշներ

Изучалось влияние сроков внесения азотного удобрения на фоне фосфорного и калийного удобрений на хозяйственно-экологические показатели озимой пшеницы. Опыты проводились в 2016-2017 гг. в условиях Разданского региона Котайкского марза.

Полученные результаты рекомендуются для применения в посевах озимой пшеницы, возделываемой фермерскими хозяйствами региона.

Азотное удобрение – срок внесения – озимая пшеница – хозяйственно-экологические показатели

The study data on the impact of application periods of the nitrogenous fertilizer in the background of phosphorus and potassium fertilizers in conditions of Hrazdan province at Kotayk region in 2016-2017 on the economic-ecological indicators of winter wheat are presented in the article.

The obtained results are recommended to invest into the winter wheat sowings cultivated by the farmers of the region.

Nitrogenous fertilizer – use terms – winter wheat – economic-ecological indices

Աշխարհում հիմնական պարենամթերքների հիմքը հանդիսացող ցորենը իր սննդարարությամբ և օգտագործման բազմազանությամբ զբաղեցնում է ուրույն տեղ:

Աշնանացան ցորենի բերքատվությունը համեմատած զարնանացանի հետ ավելի բարձր է ու կայուն: Բարձր բերքատվությունը հիմնականում պայմանավորված է այդ մշակաբույսի կենսաբանական առանձնահատկություններով՝ սննդանյութերի կլանումը կատարվում է առավել երկար ժամանակահատվածում:

Բազմաթիվ աշխատանքներում նշվում է, որ աշնանացան ցորենի և առհասարակ հացահատիկային մշակաբույսերի բերքն ու որակը մեծապես պայմանավորված են արտաքին միջավայրի պայմաններով և բույսերի կենսաբանական առանձնահատկություններով [1, 2, 3, 4, 6]: Ըստ հիշյալ աշխատանքների աշնանացան ցորենի աճի ու զարգացման և ձմեռելու համար հողից նրա վերցրած սննդատարրերի քանակի վրա մեծապես ազդում են միջավայրը, սորտային առանձնահատկությունները և հատկապես հանքային սննդառության պայմաններն ու սննդատարրերի տեսակն ու քանակը:

Հետևաբար աշխանացան ցորենի բերքատվության բարձրացման, բարձրորակ ու տնտեսապես ձեռնտու հացահատիկի արտադրության ապահովմանն ուղղված ուսումնասիրությունները չափազանց կարևոր են, այժմեական և բխում են հանրապետության գյուղատնտեսության ռազմավարության պահանջներից:

Նյութ և մեթոդ: Ուսումնասիրությունները տարվել են 2016-2017 թթ. Հրազդանի տա-րածաշրջանի Քաղսի համայնքի պայմաններում: Արժանահավատ տվյալներ ստանալու նպատակով միևնույն հողատիպի և տարածքի վրա նույն սխեմայով դրվել են երկու դաշտային փորձեր՝ 3-ական կրկնողություններով, յուրաքանչյուր փորձում ամեն մի փորձամարզի մեծությունը կազմել է 30 մ²:

Փորձադաշտերի սևահողերը միջակ հումուսացված են (4,7 %), ունեն չեզոքին մոտ միջավայ-րի ռեակցիա (рН 6,9-7,0), հեշտ հիդրոլիզվող ազոտով թույլ են ապահովված (5,2 մգ/100 գ հողում), շարժուն ֆոսֆորով միջակ (8,6-9,0 մգ/100 գ) և փոխանակային կալիումով լավ (33,0-34,0 մգ/100 գ) ապահովված հողեր են, որտեղ կլանված կատիոնների գումարը կազմում է 35,4-36,0 մգ-էկ. 100 գ հողում (աղ. 1):

Աղյուսակ 1. Փորձադաշտերի հողերի ագրոքիմիական ցուցանիշները

Հողատիպը, փորձադաշտի համարը	Բնությունը, սմ	Հումուսը, %	рН-ը ջրային բաժանվածքում	Կլանված կատիոնները, մգ-էկ. 100 գ հողում			Շարժուն սննդատարրերի պարունակությունը, մգ. 100 գ հողում		
				Ca ⁺²	Mg ⁺²	գումարը	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
Սևահող № 1	0-25	4,7	6,9	26,0	9,4	35,4	5,15	8,6	34,0
Սևահող № 2	0-25	4,7	7,0	26,4	9,6	36,0	5,20	9,0	33,0

Հետազոտությունները նպատակ են հետապնդել ուսումնասիրել ֆոսֆորական և կալիումա-կան պարարտանյութերի ֆոնի վրա ազոտական պարարտանյութի միանվագ (աշխանը) և կոտո-րակային (աշխանը և գարնանը) կիրառման ազդեցությունը աշխանացան ցորենի բերքատվության, բերքի քանակի ու որակական ցուցանիշների, ինչպես նաև տնտեսական արդյունավետության վրա:

Դաշտային փորձերը (№ 1 և № 2) դրվել են հետևյալ տարբերակներով՝ 1. Ստուգիչ (առանց պարարտացման), 2. P₉₀K₉₀, 3. N₁₂₀P₉₀K₉₀, 4. N₆₀P₉₀K₉₀+N₆₀, 5. N₃₀P₉₀K₉₀+N₉₀: Ֆոսֆորական և կալիում-ական պարարտանյութերը բոլոր տարբերակներում տրվել են աշխանը ցանքակից, իսկ ազոտական պարարտանյութը մի դեպքում լրիվ նորման միանվագ աշխանը ցանքակից, մյուս դեպքերում կոտորակային՝ աշխանը և գարնանը: Մի դեպքում ազոտի ամբողջ նորմայի կեսը աշխանը ցան-քակից, մյուս կեսը գարնանը՝ սնուցմամբ, մյուս դեպքում (5-րդ տարբերակ) ազոտի նորմայի 1/4-ը աշխանը, իսկ 3/4-ը գարնանը՝ սնուցմամբ:

Ցորենի հատիկներում մոխրի պարունակությունը որոշվել է չոր մոխրացման մեթոդով, մու-ֆեյի վառարանում 450-525°C պայմաններում, թաղանթանյութը՝ Հենեբերգ-Շտոմանի մեթոդով, հում պրոտեինը՝ Կյելդալի մեթոդով, իսկ բնաքաշը որոշվել է մեկ լիտրանոց ապակյա անոթում լցված հատիկների կշռով, արտահայտելով գ/լ-ով [7]:

Աշխանացան ցորենի հատիկի բերքի տվյալները ենթարկվել են մաթեմատիկական վերլու-ծության, փորձի սխալի (Sx, %) և ամենաեական տարբերության (մէS_{0,95}, g) որոշումով, դիսպերսիոն անալիզի մեթոդով [4]:

Արդյունքներ և քննարկում: Դաշտային փորձերի արդյունքները ցույց են տվել, որ ֆոսֆորական և կալիումական պարարտանյութերի ֆոնի վրա ազոտի նույն չափա-քանակի միանվագ և կոտորակային կիրառման եղանակները որոշակի ազդեցություն են ունեցել աշխանացան ցորենի բերքի կառուցվածքային տարրերի, ինչպես նաև հատիկի ու ծղոտի բերքի քանակների ավելացման վրա: Ֆոնի վրա ազոտական պարարտանյութի կոտորակային կիրառումից միանվագ կիրառման համեմատ 1,9-3,5 գ ավելացել է 1000 հատիկի զանգվածը, 3-6 գ/լ-ով՝ բնաքաշը, իսկ հասկի երկարությունը ավելացել է 0,2-0,3 սմ-ով: Նույն ֆոնի վրա ազոտի կոտորակային կիրառումը առավել բարերար է ազդել բույսերի աճի, զարգացման, բերքի կառուցվածքային տարրերի ու բերքատվության վրա, քան նույն չափաքանակի միանվագ օգտագործումը: Այսպես, եթե P₉₀K₉₀ տարբերակում առանց պարարտացման տարբերակի համեմատությամբ հատիկի բերքի հավելումը կազմել է 8,2 գ/հա կամ 33,3 %, ապա նույն ֆոնի վրա ազոտի 120 կգ/հա նորմայի և

միանվագ և կոտորակային կիրառության տարբերակներում բերքի հավելումը կազմել է 15,2-25,3 g/հա կամ 61,8-102,8 % (աղ. 2):

Աղ. 2-ի տվյալներից միևնույն ժամանակ երևում է, որ PK ֆոնի վրա ազոտի կոտորակային կիրառումը միանվագ կիրառման համեմատ հատիկի բերքի հավելումը ավելացրել է 4,1-10,1 g/հա-ով կամ 10,3-25,4 %-ով, իսկ ծղոտի բերքի հավելումը՝ 3,6-8,1 g/հա-ով կամ 5,0-11,2 %-ով:

Լաբորատոր հետազոտությունների արդյունքները ցույց են տվել, որ ֆոսֆորական և կալիումական պարարտանյութերի ֆոնի վրա ազոտական պարարտանյութի միանվագ (ցանքակից) և կոտորակային կիրառումը (ցանքակից և սնուցմամբ) որոշակի ազդեցություն է թողել աշնանացան ցորենի հատիկի որակական ցուցանիշների վրա (աղ. 3):

Աղ. 3-ի տվյալներից երևում է, որ հանքային պարարտանյութերի ազդեցությունը ակնհայտ է հատիկի բնաքաշի, հատիկում մոխրի, թաղանթանյութի և հում պրոտեինի պարունակության վրա: Երկու փորձերի միջին տվյալներով եթե միայն ֆոսֆոր և կալիում ստացած տարբերակում հատիկի բնաքաշը կազմել է 779 գ/լ կամ ստուգիչից 11 գ/լ-ով ավելին, իսկ մոխրի պարունակությունը կազմել է 1,9 %, թաղանթանյութինը՝ 3,0 %, հում պրոտեինինը՝ 10,1 %, ապա նույն ֆոնի վրա ազոտական պարարտանյութի կիրառման տարբերակներում այդ ցուցանիշները եղել են համապատասխանաբար 786-792 գ/լ, 1,66-1,73 %, 2,7-3,0 % և 12,3-12,7 %:

Հայտնի է, որ ցորենի հատիկում որբան ցածր է մոխրի և թաղանթանյութի պարունակությունը և բարձր՝ հում պրոտեինը, այնքան բարձր է ցորենի որակական ցուցանիշները:

Լաբորատոր հետազոտությունները միևնույն ժամանակ ցույց են տվել, որ ազոտական պարարտանյութի կոտորակային կիրառությունը միանվագի համեմատությամբ ավելի որակյալ է ազդել ցորենի որակական ցուցանիշների բարելավման վրա:

Երբ PK ֆոնի վրա ազոտի 120 կգ/հա լրիվ նորման տրվել է աշնանը ցանքակից եղանակով, ցորենի բնաքաշը կազմել է 786 գ/լ, ապա նույն ֆոնի վրա ազոտի նորմայի 50 %-ը կամ 25 %-ը աշնանը ցանքակից և զարնանը լրիվ նորմայի մյուս մասերը՝ համապատասխանաբար 50 և 75 %-ը, զարնանը սնուցմամբ տալու դեպքում ցորենի բնաքաշը միանվագի համեմատությամբ ավելացել է 3-6 գ/լ-ով: Համանման օրինաչափություն նկատվել է նաև հատիկում մոխրի, թաղանթանյութի և հում պրոտեինի նկատմամբ: Ազոտի կոտորակային կիրառումը միանվագի համեմատությամբ բարձրացրել է հում պրոտեինի և իջեցրել մոխրի և թաղանթանյութի քանակները:

Եթե ֆոնի վրա ազոտի 120 կգ/հա չափաքանակը միանվագ աշնանը ցանքակից կիրառելու դեպքում հատիկում մոխիրը կազմել է 1,73 %, թաղանթանյութը՝ 3,0 %, իսկ հում պրոտեինը՝ 12,3 %, ապա 4-րդ և 5-րդ տարբերակներում ազոտի մի մասը աշնանը ցանքակից և մյուս մասը զարնանը սնուցմամբ կիրառելու դեպքում համապատասխանաբար մոխիրը կազմել է 1,68 և 1,66 %, թաղանթանյութը՝ 2,8 և 2,7 %, իսկ հում պրոտեինը՝ 12,5 և 12,7 %:

Ինչպես վերը կատարած հետազոտությունները նպատակ են հետապնդել պարզելու Կոտայքի մարզի Հրազդանի տարածաշրջանի պայմաններում հանքային պարարտանյութերի կիրառման տարբեր ժամկետների ազդեցությունը աշնանացան ցորենի բերքի քանակի ու որակի, ինչպես նաև դրա տնտեսական արդյունավետության վրա:

Հաշվարկները ցույց են տվել, որ հանքային պարարտանյութերի օգտագործումը աշնանացան ցորենի ցանքերում ապահովել է բարձր տնտեսական արդյունավետություն (աղ. 4):

Աղ. 4-ի տվյալների վերլուծությունը ցույց է տալիս, որ դաշտային երկու փորձերի արդյունքներով ֆոսֆորական և կալիումական պարարտանյութերի ֆոնի վրա ազոտի կոտորակային կիրառումը միանվագ աշնանը ցանքակից օգտագործման համեմատ, առավել բարերար ազդելով աշնանացան ցորենի բերքի քանակի և որակի վրա, նույնպես առավել բարձր շահույթ է ապահովել: Այսպես, եթե $N_{120}P_{90}K_{90}$ տարբերակում, որտեղ ազոտական պարարտանյութի ամբողջ նորման տրվել էր ցանքակից ապահովել է 86,6 հազ. դրամ օգուտ և մեկ ծախսված դրամի հաշվով՝ 0,61 դրամ լրացուցիչ օգուտ, ապա $N_{60}P_{90}K_{90}$ աշնանը + N_{60} զարնանը՝ սնուցմամբ և $N_{30}P_{90}K_{90}$ աշնանը + N_{90} զարնանը տարբերակներում համապատասխանաբար ստացվել է 139,5 և 228,0 հազ. դրամ օգուտ և մեկ ծախսված դրամի հաշվով՝ 0,93 և 1,5 դրամ լրացուցիչ շահույթ:

Աղյուսակ 2. Ֆոսֆորական և կալիումական պարարտանյութերի ֆոնի վրա ազդողական պարարտանյութի կիրառման ժամկետների ազդեցությունը աշխանացան ցորենի բերքատվության վրա

Հ/հ	Տարբերակները	Փորձ № 1					Փորձ № 2					Երկու փորձերի միջինը				
		հատիկի բերքը ըստ կրկնողությունների, կգ/100 մ²			հատիկի միջին բերքը, գ/հա	ծղոտի միջին բերքը, գ/հա	հատիկի բերքը ըստ կրկնողությունների, կգ/100 մ²			հատիկի միջին բերքը, գ/հա	ծղոտի միջին բերքը, գ/հա	հատիկի միջին բերքը, գ/հա	բերքի հավելումը		ծղոտի միջին բերքը, գ/հա	հատիկի և ծղոտի հարաբերությունը
		I	II	III			I	II	III				g/հա	%		
1	Առանց պարարտացման (ստուգիչ)	25,0	24,0	23,6	24,2	42,0	25,0	24,2	25,8	25,0	43,0	24,6	-	-	42,5	1:1,7
2	P ₉₀ K ₉₀ - ֆոն (աշնանը)	33,6	31,4	32,8	32,6	52,6	34,0	33,2	31,4	32,9	54,2	32,8	8,2	33,3	53,4	1:1,6
3	Ֆոն + N ₁₂₀ (աշնանը)	38,4	39,4	40,4	39,4	71,6	39,8	40,6	40,2	40,2	73,0	39,8	15,2	61,8	72,3	1:1,8
4	Ֆոն + (N ₆₀ (աշնանը) + N ₆₀ (գարնանը))	44,0	43,0	44,4	43,8	75,4	44,8	44,0	43,2	44,0	76,4	43,9	19,3	78,5	75,9	1:1,7
5	Ֆոն + N ₃₀ (աշնանը) + N ₉₀ (գարնանը)	49,0	49,3	50,2	49,5	79,5	50,3	50,6	50,0	50,3	81,3	49,9	25,3	102,8	80,4	1:1,6
Sx, % ԱԷS _{0,95} , g		0,9 1,5										2,1 3,1				

Աղյուսակ 3. Ֆոսֆորական և կալիումական պարարտանյութերի ֆոնի վրա ազոտական պարարտանյութի կիրառման ժամկետների ազդեցությունը աշնանացան ցորենի հատիկի որակական ցուցանիշների վրա

Գ/հ	Տարբերակները	Փորձ № 1				Փորձ № 2				Երկու փորձերի միջինը			
		ընթացք, գ/լ	%			ընթացք, գ/լ	%			ընթացք, գ/լ	%		
			միլի	թաղանթանյութ	հում պրոտեին		միլի	թաղանթանյութ	հում պրոտեին		միլի	թաղանթանյութ	հում պրոտեին
1	Առանց պարարտացման (ստուգիչ)	766	1,79	3,4	9,6	770	1,81	3,2	9,4	768	1,80	3,3	9,5
2	$P_{90}K_{90}$ - ֆոն (աշնանը ցանքակից)	778	1,90	3,1	10,0	780	1,90	2,9	10,2	779	1,90	3,0	10,1
3	$N_{120}P_{90}K_{90}$ (աշնանը ցանքակից)	785	1,72	3,0	12,4	796	1,74	3,0	12,2	786	1,73	3,0	12,3
4	$N_{60}P_{90}K_{90}$ (աշնանը ցանքակից)+ N_{60} (գարնանը սնուցմամբ)	788	1,67	2,9	12,6	790	1,69	2,7	12,4	789	1,68	2,8	12,5
5	$N_{30}P_{90}K_{90}$ (աշնանը ցանքակից)+ N_{90} (գարնանը սնուցմամբ)	792	1,65	2,8	12,8	792	1,67	2,6	12,6	792	1,66	2,7	12,7

Աղյուսակ 4. Ֆոսֆորական և կալիումական պարարտանյութերի ֆոնի վրա ազդողական պարարտանյութի կիրառման ժամկետների տևտեսական արդյունավետությունը աշնանացան ցորենի ցանքերում

Ցուցանիշները	Երկու փորձերի միջինը				
	առանց պարարտացման (ստուգիչ)	P ₉₀ K ₉₀ - ֆոն, (աշնանը ցանքակից)	ֆոն + N ₁₂₀ (աշնանը ցանքակից)	ֆոն + N ₆₀ (աշնանը ցանքակից)+N ₆₀ (գարնանը սնուցմամբ)	ֆոն + N ₃₀ (աշնանը ցանքակից) + N ₉₀ (գարնանը սնուցմամբ)
Տարբերակների միջին բերքատվությունը, ց/հա	24,6	32,8	39,8	43,9	49,9
Ստուգիչի համեմատությամբ հատիկի հավելյալ բերքը, ց/հա	-	8,2	15,2	19,3	25,3
Հավելյալ բերքի արժեքը, հազ. դրամ	-	123	228	289,5	379,5
Հանքային պարարտանյութերի և դրանց կիրառման հետ կապված ծախսերը, հազ. դրամ	-	78	140	148	149
Հավելյալ բերքի բերքահավաքի, տեղափոխման և պահեստավորման ծախսերը, հազ. դրամ	-	0,7	1,4	2,0	2,5
Ընդամենը ծախսեր, հազ. դրամ	-	78,7	141,4	150	151,5
Ստացվել է լրացուցիչ օգուտ, հազ. դրամ	-	44,3	86,6	139,5	228,0
Ստացվել է լրացուցիչ օգուտ մեկ ծախսված դրամի հաշվով, դրամ	-	0,56	0,61	0,93	1,5

Ամփոփելով դաշտային երկու փորձերի ընթացքում կատարած ուսումնասիրությունների արդյունքները կարելի է հանգել հետևյալ հիմնական եզրակացության.

Կոտայքի մարզի Հրազդանի տարածաշրջանի պայմանական ոռոգելի սևահողերի վրա մշակվող աշնանացան ցորենի ցանքերում պարարտացման աշխատանքները հանքային պարարտանյութերով կատարելիս անհրաժեշտ է ֆոսֆորական և կալիումական պարարտանյութերի 90-ական կգ/հա նորմաների հետ ազոտի լրիվ նորմայի 30 կգ/հա հող մտցնել աշնանը՝ ցանքակից, իսկ ազոտի նորմայի մյուս մասը (N₉₀ կգ/հա) կիրառել գարնանը՝ սնուցմամբ, որի արդյունքում կստացվի 50 ց/հա հատիկի բարձրորակ բերք և ծախսված յուրաքանչյուր մեկ դրամի հաշվով կապահովվի 1,5 դրամ լրացուցիչ շահույթ, որը մասնակիորեն կբարելավվի նաև ֆերմերային տնտեսությունների եկամուտները՝ միաժամանակ բավարարելով բնակչության պահանջարկը այդ արժեքավոր ու անփոխարինելի սննդարար հատկություններով օժտված մշակաբույսի նկատմամբ:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Գալստյան Մ.Յ.* Աշնանացան ցորենի և կարտոֆիլի պարարտացման արդյունավետությունը Սևանի ավազանի պայմաններում. Երևան, Լիմուշ հրատ., 158 էջ, 2007:
2. *Գալստյան Մ.Յ.* Հանքային և օրգանական պարարտանյութերի տնտեսական արդյունավետությունը հացահատիկային և շարահերկ մշակաբույսերի ցանքերում: Տեղեկատվական տեխնոլոգիաներ և կառավարում: Երևան, № 9, էջ 447-460, 2007:
3. *Մաղաբեկյան Ա.Ա., Գյուլխասյան Մ.Ա.* Բուսաբուծություն, Եր., 391 էջ, 2000:
4. *Галстян М.А.* Эффективность органических и минеральных удобрений на посевах озимой пшеницы. Матер.-лы XV межд. симп.: “Нетрадиционное растениеводство, эниология, экология и здоровье”, III съезд селекционеров. Симферополь, с. 446-448, 2006.

5. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта. М., Колос, 336 с., 1973.
6. *Минеев В.Г., Гомонова Н.Ф., Амелянчик О.А.* Изменение свойств и плодородия дерново-подзолистой почвы при длительном комплексном применении агрохимических средств. Известия аграрной науки. Тбилиси, № 4, с. 17-21, 2006.
7. *Ягодин Б.А., Смирнов П.М., Петербургский А.В. и др.* Агрохимия (методы растительных и почвенных анализов, под ред. Б.А. Ягодина). 2-е изд., доп. М., Агропромиздат, 639 с., 1989.

Ստացվել է 10.10.2017



Biolog. Journal of Armenia, 1 (70), 2018

STATISTICAL ANALYSES OF ENZYME KINETICS: INHIBITION

A.A. HAMBARDZUMYAN

*SPC "Armbiotechnology" NAS RA
arthambardzumyan@gmail.com*

Using multivariate linear regression approach, open-source scripts have been developed in Gauss 4.0. for the calculation of the kinetic parameters and their dispersions for the cases of competitive, none competitive, mixed and substrate inhibitions. The methods of derivation of corresponding equations of stationary kinetics, their linearization and derivation of analytic forms of kinetic parameters and their dispersions are presented.

Stationary kinetics – inhibition – multivariate linear regression – kinetic parameters – calculation

Կիրառելով բազմաչափ գծային ռեգրեսիայի մոտեցումը՝ Գաուս 4.0. լեզվով հանրամատչելի ծրագրեր են մշակվել մրցակցային, անմրցակից, խառը և սուբստրատային արգելակումների դեպքերում կինետիկական պարամետրերի և դրանց դիսպերսիաների հաշվարկման համար: Ներկայացվել են ստացիոնար կինետիկայի համապատասխան հավասարումների դուրս բերման, դրանց գծայնացման և կինետիկական պարամետրերի և դրանց դիսպերսիաների հավասարումների դուրս բերման մեթոդները:

Ստացիոնար կինետիկա – արգելակում – բազմաչափ գծային ռեգրեսիա – կինետիկական պարամետրեր – հաշվարկում

Используя подход многомерной линейной регрессии, были разработаны публично доступные программы на Gauss 4.0. для расчета кинетических параметров и их дисперсий для случаев конкурентного, бесконкурентного, смешанного и субстратного типов ингибирования. Представлены методы вывода соответствующих уравнений стационарной кинетики, их линеаризации и вывода аналитических форм кинетических параметров и их дисперсий.

Стационарная кинетика – ингибирование – многомерная линейная регрессия – кинетические параметры – расчет

In biochemical researches, mostly in enzyme kinetics, the data set concerning stationary (steady state) kinetics is usually analyzed graphically. In studies of types of enzyme inhibition, the dependence of $1/v$ and s/v on i for different substrate concentrations are used [4, 14]. But this approach causes the strongest criticism from statisticians and gives very unreliable values for K_M , V_{max} and K_i . This approach did not allow estimating the weight of the experimental point when tracing the line through the set of points, and also it did not allow estimating the mistakes in determination of the kinetic parameters. Therefore, the best approach in solving the problems of enzyme inhibition is the statistical approach, namely statistical approaches based on linear regression analysis. This approach enables to estimate the kinetic parameters and their errors taking into account the weights of each experimental point [4].

Kinetic parameters of analysis of enzymatic inhibition in the case of stationary kinetics are easily calculated solving systems of linear differential equations. However, the method of King and Altman, based on graph theory, provides visual and familiar formulas for a biochemist to calculate the initial rates of enzymatic reactions, in which there are clearly distinguished parameters (maximum speed of reaction, the Michaelis constant, inhibition constants, etc.) that are interesting to us [12].

In previous paper using multivariate linear regression approach, open-source scripts have been developed in Gauss 4.0. for the calculation of the kinetic parameters and their dispersions for the cases of simple Michaelis-Menten type and the bi-bi ping-pong type enzyme kinetics [10].

Now we intend to present to the scientific community the statistical data processing methods and scripts calculating the relevant kinetic parameters of enzymatic inhibition in the case of stationary kinetics. These approaches have been used in our works concerning the enzymatic inhibition [1-3, 6-9, 11, 13].

The aim of this work is to derive equations that allow the calculation of the parameters of competitive, none-competitive, mixed and substrate type inhibitions in the case of stationary kinetics, to develop an algorithm that distinguishes among competitive, none-competitive and mixed type inhibitions, as well as to present the corresponding scripts in Gauss 4.0.

Materials and methods. The terms and symbols used by Cornish-Bowden in Chapter 10 [4] were used in the present work.

The equations for reaction velocities of competitive, none-competitive, mixed and substrate type inhibitions were derived using Kings and Altmans graph theory [12].

Equations for kinetic parameters and their variances were derived using multivariate linear regression analyses [5].

The scripts for calculation of kinetic parameters and their variances were written on the matrix language – Gauss 4.0. (Aptech Systems, Inc.).

Results and Discussion. Firstly, we are going to represent the equations and scripts for calculating the steady state kinetic parameters in the case of competitive, none-competitive and mixed type enzyme inhibitions and afterward we will discuss the kinetic parameters for substrate type enzyme inhibitions.

The equation for initial velocity of *competitive type enzyme inhibition* derived using Kings and Altmans graph theory [12] is presented in (1).

$$v = \frac{V_{max}S}{K_M + \frac{K_M}{K_I}I + S} \quad (1)$$

Where: v is initial velocity, V_{max} – maximal velocity, S – substrate concentration, K_M – Michaelis constant and K_I – inhibition constant for competitive type enzyme inhibition.

This equation is linearized as follows:

$$\frac{s}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}K_I}I + \frac{1}{V_{max}}S \quad (2)$$

Denoting:

$$\frac{S}{v} \rightarrow y, \quad 1 \rightarrow x_1, \quad I \rightarrow x_2, \quad S \rightarrow x_3, \quad \frac{K_M}{V_{max}} \rightarrow \beta_1, \quad \frac{K_M}{V_{max}K_I} \rightarrow \beta_2, \quad \frac{1}{V_{max}} \rightarrow \beta_3,$$

we can describe the linearized equation for velocity of the enzymatic reaction (2) together with measurement errors (ε) in vector form:

$$\vec{y} = \vec{X}\vec{\beta} + \vec{\epsilon} \quad (3)$$

β -s and their variances can be calculated according the Gauss-Markov theorem [5] by following equations:

$$\beta = (X'X)^{-1}X'y, \quad V_{(\beta)} = \sigma_0^2(X'X)^{-1} \quad (4)$$

where: X' is the transposed matrix X , $(X'X)^{-1}$ – inverse matrix $(X'X)$, $V_{(\beta)}$ – variances of β , and σ_0^2 – experimental variance.

When the measurements are given weights, the equations (4) are converted to (5).

$$\beta = ((wX)'X)^{-1}(wX)'y, \quad V_{(\beta)} = \sigma_0^2((wX)'X)^{-1} = \sigma_0^2Z^{-1} = \sigma_0^2U \quad (5)$$

The experimental variance is calculated from equations (6).

$$\sigma_0^2 = \frac{SS}{N-P}, \quad SS = \sum w e^2 = \sum w_i(y_i - x_i\beta_i)^2 = \sum u d^2 \quad (6)$$

where: SS is the sum of the weighted squares, N – number of measurements, P – number of degrees of freedom (for competitive type enzyme inhibition $P=3$), e – estimate of ϵ deviation of y , d – estimate of δ deviation of v , u – weight of d .

$$w \approx \frac{v^4}{S^2} \text{ were calculated by us (derivations are not presented).}$$

The equations for calculating V_{max} , K_M and K_I and their dispersions (variances) are the followings:

$$V_{max} = \frac{1}{\beta_3}, \quad K_M = \frac{\beta_1}{\beta_3}, \quad K_I = \frac{\beta_2}{\beta_3} \quad (7)$$

$$V_{(V_{max})} = V_{(\frac{1}{\beta_3})} = \sigma_0^2 \frac{M_{33}}{\beta_3^4}, \quad V_{(K_M)} = V_{(\frac{\beta_1}{\beta_3})} = \sigma_0^2 \left(\frac{M_{11}}{\beta_3^2} - 2 \frac{\beta_1 M_{13}}{\beta_3^3} + \frac{\beta_1^2 M_{33}}{\beta_3^4} \right), \quad (8)$$

$$V_{(K_I)} = V_{(\frac{\beta_2}{\beta_3})} = \sigma_0^2 \left(\frac{M_{22}}{\beta_3^2} - 2 \frac{\beta_2 M_{23}}{\beta_3^3} + \frac{\beta_2^2 M_{33}}{\beta_3^4} \right)$$

where: β_1 , β_2 and β_3 can be calculated by equations (5), σ_0^2 – by equations (6), and M_{ij} – is the (i, j) element of matrix U (5).

The equation for initial velocity of *none-competitive type enzyme inhibition* derived using Kings and Altmans graph theory [12] is presented in (9).

$$v = \frac{V_{max}S}{K_M + S + \frac{1}{K_2}IS} \quad (9)$$

where: v is initial velocity, V_{max} – maximal velocity, S – substrate concentration, K_M – Michaelis constant and K_2 – inhibition constant for none-competitive type enzyme inhibition.

This equation is linearized as follows:

$$\frac{S}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}}S + \frac{1}{V_{max}K_2}IS \quad (10)$$

Denoting:

$$\frac{S}{v} \rightarrow y, \quad 1 \rightarrow x_1, \quad S \rightarrow x_2, \quad IS \rightarrow x_3, \quad \frac{K_M}{V_{max}} \rightarrow \beta_1, \quad \frac{1}{V_{max}} \rightarrow \beta_2, \quad \frac{1}{V_{max}K_2} \rightarrow \beta_3,$$

we can describe the linearized equation for velocity of the enzymatic reaction (10) together with measurement errors (ε) in vector form (3).

Here again β -s and their variances can be calculated according the Gauss-Markov theorem [5] by equations (4).

When the measurements are given weights, the equations (4) are converted to (5).

And again experimental variance is calculated from equations (6), where in the case of none-competitive inhibition: SS is the sum of the weighted squares, N – number of measurements, P – number of degrees of freedom (for none-competitive type enzyme inhibition P=3), e – estimate of ε deviation of y, d – estimate of δ deviation of v, u – weight of d.

For none-competitive type inhibition $w \approx \frac{v^4}{S^2}$ were calculated by us (derivations are not presented).

The equations for calculating V_{max} , K_M and K_2 and their dispersions (variances) are the followings:

$$v_{max} = \frac{1}{\beta_2}, \quad K_M = \frac{\beta_1}{\beta_2}, \quad K_2 = \frac{\beta_3}{\beta_2} \quad (11),$$

$$V_{(v_{max})} = V_{(v_{\frac{1}{\beta_2}})} = \sigma_0^2 \frac{M_{22}}{\beta_2^4}, \quad V_{(K_M)} = V_{(v_{\frac{\beta_1}{\beta_2}})} = \sigma_0^2 \left(\frac{M_{11}}{\beta_2^2} - 2 \frac{\beta_1 M_{12}}{\beta_2^3} + \frac{\beta_1^2 M_{22}}{\beta_2^4} \right), \quad (12)$$

$$V_{(K_2)} = V_{(v_{\frac{\beta_3}{\beta_2}})} = \sigma_0^2 \left(\frac{M_{22}}{\beta_3^2} - 2 \frac{\beta_2 M_{23}}{\beta_3^3} + \frac{\beta_2^2 M_{33}}{\beta_3^4} \right)$$

where: β_1 , β_2 and β_3 can be calculated by equations (5), σ_0^2 – by equations (6), and M_{ij} – is the (i, j) element of matrix U (5).

The equation for initial velocity of *mixed type enzyme inhibition* derived using Kings and Altmans graph theory [12] is presented in (13).

$$v = \frac{V_{max}S}{K_M + \frac{K_M}{K_1}I + S + \frac{I}{K_2}IS} \quad (13)$$

where: v is initial velocity, V_{max} – maximal velocity, S – substrate concentration, K_M – Michaelis constant, K_1 – inhibition constant for competitive type enzyme inhibition and K_2 – inhibition constant for none-competitive type enzyme inhibition.

This equation is linearized as follows:

$$\frac{S}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}K_1}I + \frac{1}{V_{max}}S + \frac{1}{V_{max}K_2}IS \quad (14)$$

$$\begin{aligned} \text{Denoting: } \frac{S}{v} \rightarrow y, \quad I \rightarrow x_1, \quad I \rightarrow x_2, \quad S \rightarrow x_3, \quad IS \rightarrow x_4, \quad \frac{K_M}{V_{max}} \rightarrow \beta_1, \quad \frac{K_M}{V_{max}K_I} \rightarrow \beta_2, \\ \frac{I}{V_{max}} \rightarrow \beta_3, \quad \frac{I}{V_{max}K_2} \rightarrow \beta_4, \end{aligned}$$

we can describe the linearized equation for velocity of the enzymatic reaction (14) together with measurement errors (ε) in vector form (3).

Here again β -s and their variances can be calculated according the Gauss-Markov theorem [5] by equations (4).

When the measurements are given weights, the equations (4) are converted to (5).

And again experimental variance is calculated from equations (6), where in the case of mixed inhibition: SS is the sum of the weighted squares, N – number of measurements, P – number of degrees of freedom (for mixed type enzyme inhibition P=4), e – estimate of ε deviation of y, d – estimate of δ deviation of v, u – weight of d.

For mixed type inhibition $w \approx \frac{v^4}{s^2}$ were calculated by us (derivations are not presented).

The equations for calculating V_{max} , K_M , K_I and K_2 and their dispersions (variances) are the followings:

$$\begin{aligned} V_{max} = \frac{1}{\beta_3}, \quad K_M = \frac{\beta_1}{\beta_3}, \quad K_I = \frac{\beta_1}{\beta_2}, \quad K_2 = \frac{\beta_3}{\beta_4} \quad (15), \\ V_{(V_{max})} = V_{\left(\frac{1}{\beta_3}\right)} = \sigma_0^2 \frac{M_{33}}{\beta_3^4}, \quad V_{(K_M)} = V_{\left(\frac{\beta_1}{\beta_3}\right)} = \sigma_0^2 \left(\frac{M_{11}}{\beta_3^2} - 2 \frac{\beta_1 M_{13}}{\beta_3^3} + \frac{\beta_1^2 M_{33}}{\beta_3^4} \right), \\ V_{(K_I)} = V_{\left(\frac{\beta_1}{\beta_2}\right)} = \sigma_0^2 \left(\frac{M_{11}}{\beta_2^2} - 2 \frac{\beta_1 M_{12}}{\beta_2^3} + \frac{\beta_1^2 M_{22}}{\beta_2^4} \right), \quad V_{(K_2)} = V_{\left(\frac{\beta_3}{\beta_4}\right)} = \sigma_0^2 \left(\frac{M_{33}}{\beta_4^2} - 2 \frac{\beta_3 M_{34}}{\beta_4^3} + \frac{\beta_3^2 M_{44}}{\beta_4^4} \right) \end{aligned} \quad (16)$$

where: β_1 , β_2 , β_3 and β_4 can be calculated by equations (5), σ_0^2 – by equations (6), and M_{ij} – is the (i, j) element of matrix U (5).

The script with the algorithm that distinguishes among competitive, none-competitive and mixed type inhibitions, as well as calculates the parameters of guessed competitive, none-competitive or mixed type inhibitions and their variances, written in Gauss 4.0, is presented in fig. 1.

The developed logical block distinguishes among the inhibition mechanisms on the base of minimization of the mean of variances of the parameter (i) divided on the parameter for each mechanism (i=1-4 for mixed type inhibition and i=1-3 for competitive and none-competitive type inhibitions). We cannot provide the strong mathematical evidence for this phenomenon, but in every subsequently presented experimental example the inhibition mechanism obtained from the form of curves $1/v - I$ and $S/v - I$ [4] coincided with the mechanism predicted by provided script code.

We used the presented multivariate linear regression approach and corresponding script for study the mechanism of inhibition of horse acetylcholinesterase (AChE) and human butyrylcholinesterase (BChE) and corresponding kinetic parameters and their variances with newly synthesized derivative of α, β -dehydrophenylalanine (fig. 2) [1-2, 7-8].

```

A print "Results";
  n=16; k=4; l=3;
  fname="D:\\My Documents_D\\Inhib.xls";
  {dat1,names}=import(fname,"a1:c17",1);

  y=dat1[1:n,1]/dat1[1:n,3];
  w=dat1[1:n,3]^4./dat1[1:n,1]^2;
  x1=(dat1[1:n,1]/dat1[1:n,1])~(dat1[1:n,2])~(dat1[1:n,1])~(dat1[1:n,1]*dat1[1:n,2]);
  x2=(dat1[1:n,1]/dat1[1:n,1])~(dat1[1:n,2])~(dat1[1:n,1]);
  x3=(dat1[1:n,1]/dat1[1:n,1])~(dat1[1:n,1])~(dat1[1:n,1])*dat1[1:n,2];
  z1=(w.*x1)*x1; z2=(w.*x2)*x2; z3=(w.*x3)*x3;
  u1=inv(z1); u2=inv(z2); u3=inv(z3);
  b1=inv(z1)*((w.*x1)*y); b2=inv(z2)*((w.*x2)*y); b3=inv(z3)*((w.*x3)*y);
  Kma=b1[1,1]/b1[3,1]; Vmaxa=1/b1[3,1]; K1a=b1[1,1]/b1[2,1]; K2a=b1[3,1]/b1[4,1];
  Kmb=b2[1,1]/b2[3,1]; Vmaxb=1/b2[3,1]; K1b=b2[1,1]/b2[2,1];
B Kmc=b3[1,1]/b3[2,1]; Vmaxc=1/b3[2,1]; K2c=b3[2,1]/b3[3,1];
  sigma01=(w*(y-(b1*x1'))*(y-(b1*x1')))/(n-k);
  sigma02=(w*(y-(b2*x2'))*(y-(b2*x2')))/(n-l);
  sigma03=(w*(y-(b3*x3'))*(y-(b3*x3')))/(n-l);
  s_Kma=(sigma01*(u1[1,1]/b1[3]^2-2*b1[1]*u1[3,1]/b1[3]^3+b1[1]^2*u1[3,3]/b1[3]^4))^0.5;
  s_Kmb=(sigma02*(u2[1,1]/b2[3]^2-2*b2[1]*u2[3,1]/b2[3]^3+b2[1]^2*u2[3,3]/b2[3]^4))^0.5;
  s_Kmc=(sigma03*(u3[1,1]/b3[2]^2-2*b3[1]*u3[2,1]/b3[2]^3+b3[1]^2*u3[2,2]/b3[2]^4))^0.5;
  s_Vmaxa=(sigma01*u1[3,3]/b1[3]^4)^0.5;
  s_Vmaxb=(sigma02*u2[3,3]/b2[3]^4)^0.5;
  s_Vmaxc=(sigma03*u3[2,2]/b3[2]^4)^0.5;
  s_K1a=(sigma01*(u1[1,1]/b1[2]^2-2*b1[1]*u1[2,1]/b1[2]^3+b1[1]^2*u1[2,2]/b1[2]^4))^0.5;
  s_K1b=(sigma02*(u2[1,1]/b2[2]^2-2*b2[1]*u2[2,1]/b2[2]^3+b2[1]^2*u2[2,2]/b2[2]^4))^0.5;
  s_K2a=(sigma01*(u1[3,3]/b1[4]^2-2*b1[3]*u1[4,3]/b1[4]^3+b1[3]^2*u1[4,4]/b1[4]^4))^0.5;
  s_K2c=(sigma03*(u3[2,2]/b3[3]^2-2*b3[2]*u3[3,2]/b3[3]^3+b3[2]^2*u3[3,3]/b3[3]^4))^0.5;
  mix=(s_Kma/Kma+s_Vmaxa/Vmaxa+s_K1a/abs(K1a)+s_K2a/abs(K2a))/4;
  comp=(s_Kmb/Kmb+s_Vmaxb/Vmaxb+s_K1b/abs(K1b))/3;
  ncomp=(s_Kmc/Kmc+s_Vmaxc/Vmaxc+s_K2c/abs(K2c))/3;
  if mix<comp;
    goto mark;
  elseif comp<ncomp;
    print "competitive type inhibition";
    print "Km" Kmb~s_Kmb;
    print "Vmax" Vmaxb~s_Vmaxb;
    print "K1" K1b~s_K1b;
  else;
    print "noncompetitive type inhibition";
    print "Km" Kmc~s_Kmc;
C print "Vmax" Vmaxc~s_Vmaxc;
    print "K2" K2c~s_K2c;
  endif;
  print "criteria";
  print "mix/comp/ncomp" mix~comp~ncomp;
end;
mark;
if mix<ncomp;
  print "mixed type inhibition";
  print "Km" Kma~s_Kma;
  print "Vmax" Vmaxa~s_Vmaxa;
  print "K1" K1a~s_K1a;
  print "K2" K2a~s_K2a;
else;
  print "noncompetitive type inhibition";

```

Fig. 1. The script for calculating the parameters of Michaelis Menten kinetics and their variances.

A – data input block in the form of Excel spreadsheet for $n=16$, $k=4$ and $l=3$, B – block for calculating kinetic parameters and their standard deviations, C – data output logical block. In this script all expressions with indices (a) concerns to mixed type inhibition, expressions with indices (b) – to competitive type inhibition and expressions with indices (c) – to none-competitive type inhibition.

The studied compound was found to be a competitive inhibitor of AchE ($K_I = 11.48 \pm 0.96 \mu\text{M}$), but a mixed type inhibitor of BChE ($K_I = 0.127 \pm 0.046 \mu\text{M}$; $K_2 = 0.24 \pm 0.08 \mu\text{M}$).

We used this approach in studying the mechanism of inhibition of L-aspartate- β -decarboxylase of *Pseudomonas dacunhae* by D-aspartic acid and for calculation of corresponding parameters of inhibition [3]. In this case the competitive mechanism of inhibition was shown with following parameters: $K_M = 1.14 \pm 0.39 \text{ mM}$, $V_{max} = 3210.06 \pm 171.39 \text{ mmol/(g.h)}$, $K_I = 118.44 \pm 5.98 \text{ mM}$.

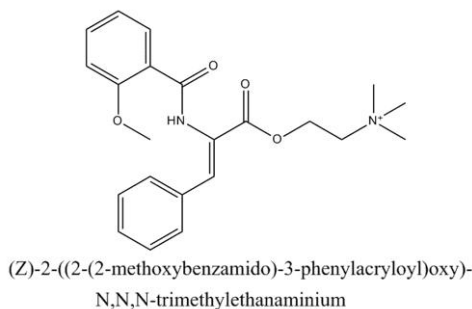


Fig. 2. The structure of α,β -dehydrophenylalanine choline ester – (Z)-2-((2-(2-methoxybenzamido)-3-phenylacryloyl)oxy)-N,N,N-trimethylethanaminium

Using the presented above statistical approach in studying the inhibition of bovine trypsin by newly synthesized nonproteinaceous amino acids and peptides on their base showed, that (2R,3S)- β -hydroxyleucine and N-formyl-(S)-methionyl-(2R,3S)- β -hydroxyleucine inhibited the enzyme by competitive mechanism with $K_I = 0.842 \pm 0.203$ and $K_I = 0.312 \pm 0.085$ mM, correspondingly [11].

In the case of *Rhodotorulla aurantiaca* KM-1 phenylalanine ammonia-lyase we also demonstrated the competitive inhibition of enzyme by D-phenylalanine with $K_I = 3.38 \pm 0.32$ mM [6], using the presented above statistical approach.

We used this approach in studying the mechanism of inhibition of aminotransferases of *Erwinia carotovora* by L- β -(N-benzylamino)alanine and L- β -(N-methylamino)alanine in saturating concentrations of cosubstrate – keto acid (10 mM) [13]. It was shown that L- β -(N-benzylamino)alanine was a competitive inhibitor with respect to L-phenylalanine for PAT1 ($K_I = 0.32 \pm 0.07$ mM, $K_M = 0.45 \pm 0.10$ mM, $V_{max} = 11.6 \pm 0.4$ U/mg). L- β -(N-methylamino)alanine is a noncompetitive inhibitor with respect to L-phenylalanine for PAT3 ($K_2 = 138.4 \pm 95.4$ mM, $K_M = 13.7 \pm 3.9$ mM, $V_{max} = 18.6 \pm 4.1$ U/mg).

We also used this approach in studying the mechanism of inhibition of L-aminoacylase of *Rhodococcus armeniensis* AM6.1 by the reaction product – acetate [9]. The results confirmed a competitive type of enzyme inhibition with the following kinetic parameters: $K_I = 104.7 \pm 21.6$ mM, $K_M = 2.5 \pm 0.4$ mM, $V_{max} = 25.1 \pm 1.5$ U/mg.

The equation for initial velocity of *substrate inhibition type reaction kinetics*, derived using King and Altman approach [12], is presented in (17).

$$v = \frac{V_{max}S}{K_M + S + \frac{S^2}{K_S}} \quad (17)$$

where: v is initial velocity, V_{max} – maximal velocity, S – concentration of substrate and K_S – constant of substrate inhibition.

This equation is linearized as follows:

$$\frac{S}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}}S + \frac{1}{V_{max}K_S}S^2 \quad (18)$$

Denoting:

$$\frac{S}{v} \rightarrow y, \quad 1 \rightarrow x_1, \quad S \rightarrow x_2, \quad S^2 \rightarrow x_3, \quad \frac{K_M}{V_{max}} \rightarrow \beta_1, \quad \frac{1}{V_{max}} \rightarrow \beta_2, \quad \frac{1}{V_{max}K_S} \rightarrow \beta_3,$$

we can describe the linearized equation for velocity of the enzymatic reaction (18) together with measurement errors (ε) in vector form (3) as in the case of simple Michaelis-Menten kinetics. Here also β -s and their variances can be calculated according the Gauss-Markov theorem [5] by equations (4). When the measurements are given weights, the equations (4) are converted to (5). Here also the experimental variance is calculated from equations (6).

$$\sigma_0^2 = \frac{SS}{N-P}, \quad SS = \sum w e^2 = \sum w_i (y_i - x_i \beta_i)^2 = \sum u d^2 \quad (6)$$

Where: SS is the sum of the weighted squares, N – number of measurements, P – number of degrees of freedom (for substrate inhibition type reaction kinetics P=3), e – estimate of ε deviation of y, d – estimate of δ deviation of v, u – weight of d.

$$w \approx \frac{v^4}{S^2} \text{ were calculated by us (derivations are not presented).}$$

The equations for calculating K_M , V_{max} and K_S and their variances are the followings:

$$K_M = \frac{\beta_1}{\beta_2}, \quad K_S = \frac{\beta_2}{\beta_3}, \quad V_{max} = \frac{1}{\beta_2} \quad (19)$$

$$V_{(K_M)} = V_{\left(\frac{\beta_1}{\beta_2}\right)} = \sigma_0^2 \left(\frac{M_{11}}{\beta_2^2} - 2 \frac{\beta_1 M_{12}}{\beta_2^3} + \frac{\beta_1^2 M_{22}}{\beta_2^4} \right), \quad V_{(K_S)} = V_{\left(\frac{\beta_2}{\beta_3}\right)} = \sigma_0^2 \left(\frac{M_{22}}{\beta_3^2} - 2 \frac{\beta_2 M_{23}}{\beta_3^3} + \frac{\beta_2^2 M_{33}}{\beta_3^4} \right), \quad V_{(V_{max})} = V_{\left(\frac{1}{\beta_2}\right)} = \sigma_0^2 \frac{M_{22}}{\beta_2^4} \quad (20)$$

where: β_1 , β_2 and β_3 can be calculated by equations (5), σ_0^2 – by equations (6), and M_{ij} – is the (i, j) minor of matrix U (5).

The script code for calculating the parameters of substrate inhibition type reaction kinetics and their variances, written in Gauss 4.0, is presented in fig. 3.

We used the presented multivariate linear regression analyses and corresponding script for studying the substrate inhibition of aspartate aminotransferase of *Erwinia carotovora* by oxaloacetate and 2-ketoglutarate [13]. The calculated K_S for oxaloacetate and 2-ketoglutarate was 3.73 ± 1.99 and 10.23 ± 3.20 mM, respectively, in saturating concentrations of cosubstrate – L-phenylalanine.

We also used the multivariate linear regression analyses approach for studying the substrate inhibition in *Rhodococcus armeniensis* AM6.1 [9]. We have shown that among studied substrates N-acetyl-D-leucine and N-acetyl-DL-tyrosine inhibited the rate of their own deacetylation with the inhibition constants of 35.5 ± 28.3 and 15.8 ± 4.5 mM, respectively.

```

print "Results";
n=7; k=3;
A fname="D:\\My Documents D\\Data.xlsx";
  {dat1,names}=import(fname,"a14:b21",3);

  y=dat1[1:n,1]./dat1[1:n,2];
  w=dat1[1:n,2].^4 ./dat1[1:n,1].^2;
  x=(dat1[1:n,1]./dat1[1:n,1])~(dat1[1:n,1])~(dat1[1:n,1]).^2;
  z=(w.*x)*x;
  u=inv(z);
B b=inv(z)*((w.*x)*y);
  Km=b[1,1]/b[2,1]; Vmax=1/b[2,1]; Ks=b[2,1]/b[3,1];
  sigma0=(w'*(y-(b'*x'))*(y-(b'*x')))/(n-k);
  s_Km=(sigma0*(u[1,1]/b[2]^2-2*b[1]*u[1,2]/b[2]^3+b[1]^2*u[2,2]/b[2]^4))^0.5;
  s_Vmax=(sigma0*u[2,2]/b[2]^4)^0.5;
  s_Ks=(sigma0*(u[2,2]/b[3]^2-2*b[2]*u[2,3]/b[3]^3+b[2]^2*u[3,3]/b[3]^4))^0.5;

  print "substrate inhibition";
  print "Km" Km~s_Km;
C print "Vmax" Vmax~s_Vmax;
  print "Ks" Ks~s_Ks;
end;

```

Fig. 3. The script code for calculating the parameters of substrate inhibition type reaction kinetics and their variances. A – data input block in the form of Excel spreadsheet for $n=7$ and $k=3$, B – block for calculating kinetic parameters and their standard deviations, C – data output block.

Thus, using multivariate linear regression approach, open-source scripts have been developed for the calculation of the kinetic parameters and their dispersions for the different cases of enzyme catalyzed reactions inhibition, including the cases of competitive, none competitive, mixed and substrate inhibitions.

REFERENCES

1. Григорян А.А., Амбарцумян А.А., Мкртчян М.В., Топузьян В.О., Алебян Г.П., Асатрян Р.С. Синтез и антихолинэстеразная активность 2-(диметиламино) этиловых и холиновых эфиров N-замещенных α,β -дегидроаминокислот. Химико-фармацевтический журнал, 40, 3, 18-23, 2006.
2. Григорян А.А., Амбарцумян А.А., Мкртчян М.В., Топузьян В.О., Алебян Г.П. Новые обратимые ингибиторы холинэстераз на основе аминоэтиловых эфиров α,β -дегидроаминокислот. Биолог. журн. Армении, 57, 1-2, 3-7, 2005.
3. Дюкова К.Г., Агаджанян А.Е., Амбарцумян А.А., Алебян Г.П. Усовершенствованная технология получения D-аспарагиновой кислоты и L-аланина путем биотрансформации DL-аспарагиновой кислоты. Биотехнология, 4, 69-77, 2009.
4. Корниш-Бовден Э. Основы ферментативной кинетики, "Мир", М., 282 С., 1979.
5. Магнус Я.Р., Катышев П.К., Пересецкий А.А. Эконометрика, "Дело", М., 399 С., 2000.
6. Bazukyan I.L., Vardanyan A.E., Ambartsumyan A.A., Tozalakyan P.V., Popov Yu. G. Catalytic Properties of *Rhodotorula aurantiaca* KM-1 Phenylalanine Ammonia-Lyase Applied Biochemistry and Microbiology, 45, 1, 17-21, 2009.
7. Grigoryan H.A., Hambardzumyan A.A., Mkrтчян M.V., Topuzyan V.O., Halebyan G.P., Asatryan R.S. α,β -Dehydrophenylalanine choline esters: potent reversible inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. Electronic Journal of Natural Sciences, Biotechnology, NAS of RA, 6, 1, 14-20, 2006.
8. Grigoryan H.A., Hambardzumyan A.A., Mkrтчян M.V., Topuzyan V.O., Halebyan G.P., Asatryan R.S. α,β -Dehydrophenylalanine choline esters, a new class of reversible inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. Chem. Biol. Interact., 171, 108-116, 2008.

9. *Hambardzumyan A.A., Mkhitarian A.V., Paloyan A.M., Dadayan S.A., Saghyan A.S.* Catalytic Properties of Aminoacylase of Strain *Rhodococcus Armeniensis* AM6.1 *Applied Biochemistry and Microbiology*, 52, 3, 250-255, 2016.
10. *Hambardzumyan A.A.* Statistical analyses of enzyme kinetics: simple Michaelis-Menten and bi-bi ping-pong, *Biolog. Journal of Armenia*, 69, 2, 6-12, 2017.
11. *Hovhannisyan N, Harutyunyan Sh, Hovhannisyan A, Hambardzumyan A, Chitchyan M, Melkumyan M, Oganezova G, Avetisyan N.* The novel inhibitors of serine proteases, *Amino Acids*, 37, 3, 531-536, 2009.
12. *King E.L., Altman C.A.* Schematic method of deriving the rate laws for enzyme-catalyzed reactions. *J. Phys. Chem.*, 60, 1375-1378, 1956.
13. *Paloyan A.M., Stepanyan L.A., Dadayan S.A., Hambardzumyan A.A., Halebyan Gh.P. Saghiyan A.S.* Catalytic properties of enzymes from *Erwinia carotovora* involved in trans-amination of phenylpyruvate *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49, 2, 106-112, 2013.
14. *Velick S.F. and Vavra J.* A kinetic and equilibrium analysis of the glutamic oxaloacetate transaminase mechanism. *J. Biol. Chem.*, 237, 7, 20109-20122, 1962.

Received on 25.09.2017

|



Биол. журн. Армении, 1 (70), 2018

ДРЕВЕСНЫЕ РАСТЕНИЯ И ДЕНДРОЦЕНОЗЫ СУБАЛЬПИЙСКОЙ ЗОНЫ СЕВЕРО-ВОСТОЧНОЙ АРМЕНИИ

Ж.А. ВАРДАНЯН, А.К. МХИТАРЯН

Институт ботаники имени А. Тахтаджяна НАН РА
Ванадзорский госуниверситет имени О. Туманяна
botinst@sci.am
hasmik-mkhitarian88@mail.ru

Дендроклиматические условия субальпийской зоны Армении, в частности, северо-восточной ее части, неблагоприятны для произрастания древесных растений. Поэтому в субальпийском поясе исследуемого нами региона дендрофлора отличается сравнительно бедным составом – 52 вида из 32 родов и 20 семейств, что составляет всего лишь 14% от общего таксономического разнообразия. Из них 20 видов низкорослые кривоствольные деревья (*Betula litwinowii*, *Acer trautvetteri*, *Sorbus aucuparia*, *Salix caprea*) и 31 вид кустарники, среди которых наибольший интерес представляет *Rhododendron caucasicum* – реликт третичного периода. Многие из встречающихся в исследованных дендроценозах древесных растений являются реликтами и в связи с их редкостью и уязвимостью занесены в Красную книгу растений Армении.

Древесное растение – дендрофлора – реликт – дендроценоз

Հայաստանի և մասնավորապես նրա հյուսիսարևելյան մասի մերձալպյան գոտին բնորոշվում է ծառաբույսերի աճման համար անբարենպաստ դենդրոկլիմայական պայմաններով: Դա է պատճառը, որ հետազոտվող տարածաշրջանի մերձալպյան գոտու դենդրոֆլորան աչքի է ընկնում համեմատաբար աղքատ կազմով՝ 20 ընտանիքի և 32 ջեղի պատկանող 52 տեսակ: Այդ տեսակները կազմում են հանրապետության ծառաբույսերի տաքսոնոմիական բազմազանության ընդամենը 14%-ը: Դրանցից 20-ը ցածր աճ և կորաբուն ծառատեսակներ են (*Betula litwinowii*, *Acer trautvetteri*, *Sorbus aucuparia*, *Salix caprea*) 31-ը թփեր, որոնցից առավել տարածվածը երրորդական դարաշրջանի ռելիկտ՝ *Rhododendron caucasicum* է: Տվյալ անտառաճման պայմանների դենդրոցենոզներում հանդիպող ծառաբույսերը ռելիկտներ են և որպես հազվագյուտ տեսակներ ներառված են Հայաստանի բույսերի Կարմիր գրքում:

Ծառաբույս – դենդրոֆլորա – ռելիկտ – դենդրոցենոզ

The dendroclimatic conditions of the subalpine belt of Armenia, in particular its north-eastern part, are unfavorable for the growth of woody plants. So, at the subalpine belt of the region, under investigation the dendroflora is characterized by a relatively poor composition – 52 species from 32 genera and 20 families, which makes up only 14% of the total taxonomic diversity of the Republic. Out of these, 20 species are lower and stunted trees (*Betula litwinowii*, *Acer trautvetteri*, *Sorbus aucuparia*, *Salix caprea*) and 31 species are shrubs, among which the most interesting is *Rhododendron caucasicum*, a relict of the Tertiary period. Major part of the woody plants in the investigated conditions are relicts and, being rare, are listed in the Red Data Book of plants of Armenia.

Woody plants – dendroflora – relict – dendrocenosis

Как правило, в горных условиях распространение древесных растений и древесной растительности обусловлено экологическими факторами, из которых решающими являются климатические и эдафические. Важное значение имеют также орографические: рельеф, экспозиция и крутизна склонов, которые на каждом шагу меняют микроклимат, почву, вследствие чего меняются состав и характер растительного покрова.

Закономерности вертикальной распространенности древесных растений в Армении изучены достаточно хорошо [2, 3, 5, 7, 9]. В указанных работах приводятся довольно богатые сведения по выявлению закономерностей высотного распространения, в частности, на верхнем пределе (субальпийский пояс) их произрастания.

Верхняя граница отличается суровыми условиями для распространения древесных растений и их ценозов. В этой зоне формируется холодный горный климат с коротким (2-3 месяца) вегетационным периодом. Зима здесь продолжительная, суровая, средняя температура воздуха в январе $-10-13^{\circ}\text{C}$, абсолютный минимум -42°C . Лето кратковременное, прохладное, средняя температура августа $13-15^{\circ}\text{C}$, абсолютный максимум около $30-32^{\circ}\text{C}$, годовая сумма осадков 600-700 мм. В таких неблагоприятных условиях для роста и развития древесных растений, как правило, практически отсутствуют смыкание крон деревьев в древостоях и семенное возобновление. Дендроценозы приобретают вид редколесий, деревья отличаются крайне низким ростом, а во многих случаях приобретают кустообразную форму.

В северо-восточной Армении древесные ценозы (субальпийские криволесья) тянутся узкой полосой – 50-150 (200) м и представляют как бы верхнюю опушку леса, постепенно переходящую обычно в нижеальпийские луга (буковые, дубовые, березовые, кленовые редколесья), выше которых высокоствольные древесные формации практически отсутствуют.

Как известно, альпийская граница распространения деревьев и кустарников обуславливается коротким вегетационным периодом и недостатком тепла в летний период. Эта граница в Армении проходит на высоте 2500-2700 м над ур. моря. Однако как свидетельствуют исторические, археологические, палеоботанические и другие данные, лесопокрываемая территория Армении в прошлом была почти в 2.5-3 раза больше, и еще в первом тысячелетии до н. э. лесистость республики составляла около 35% [18]. В настоящее время в северо-восточных лесорастительных районах верхняя граница лесов, по сравнению с центральными и юго-восточными, проходит довольно низко на высоте: 1900-2000 м над ур. моря. В юго-восточной Армении (Зангезур-Мегри) она проходит на высотах 2500-2600 м. Поэтому гораздо беднее дендрофлора представлена на верхнем пределе распространения древесных ценозов – в экстремальных условиях местопроизрастания на высотах 2500-2700 м, где единичные низкорослые деревья и кустарники (кустарнички), число которых не превышает 30-35 видов, образуют субальпийские криволесья (*Quercus macranthera*, *Acer trautvetteri*, *Betula litwinowii*, *Sorbus aucuparia*, *Salix caprea*) или небольшие заросли низкорослых кустарников и кустарничков: *Juniperus hemisphaerica*, *Rhododendron caucasicum*, *Vaccinium uliginosum*, *Rubus idaeus* и др. [2, 3].

Материал и методика. Материалом для выполнения данной работы послужили древесные растения, изученные авторами в результате экспедиционных выездов в субальпийскую зону северо-восточной Армении: Лорийский и Иджеванский флористические районы.

В течение вегетационного сезона (2014-2017 гг.) нами собран гербарный материал древесных растений для уточнения и установления таксономического состава. При этом использовались различные определители и флористические сводки [3, 8, 13, 17], а также многочисленные работы по отдельным таксонам и дендроценозам.

Исследование дендроценозов проводилось в соответствии с методическими указаниями по лесной биогеоценологии [10, 11, 15, 16].

Результаты и обсуждение. На основании собственных исследований по выявлению таксономического состава древесных растений субальпийской зоны северо-восточной Армении–Лорийского и Иджеванского флористических районов уточнен и установлен состав дендроразнообразия, насчитывающий 52 вида, относящихся к 32 родам и 19 семействам (табл.1).

Таблица 1. Дендрологический состав субальпийской зоны северо-восточной Армении

Вид	Жизненная форма	Дендроценозы	Распространенность в других флористических районах	Высотные пределы встречаемости, тыс. м над ур. м.
1	2	3	4	5
Cupressaceae				
<i>Juniperus hemisphaerica</i>	К	субальпийские луга	Почти повсюду, кроме Ширака	1.1-2.8
Pinaceae				
<i>Pinus kochiana</i>	Д	древостои верхнего предела леса	отсутствует	0.8-2.1
Aceraceae				
<i>Acer trautvetteri</i>	Д	субальпийские криволесья	Мегринский	1.6-2.6
Betulaceae				
<i>Betula litwinowi</i>	Д	субальпийские криволесья	Почти повсюду, кроме Ширака	1.7-2.7
<i>B. pendula</i>	Д	субальпийские криволесья	Почти повсюду, кроме Ширака	1.4-2.6
<i>P. pubescens</i>	Д	субальпийские криволесья	Почти повсюду, кроме Ширака	1.8-2.4
Caprifoliaceae				
<i>Lonicera caucasica</i>	К	кустарниковые заросли	Все лесистые районы	0.9-2.3
<i>Viburnum lantana</i>	К	отсутствует	Все лесистые районы	1.0-2.4
Celastraceae				
<i>Euonymus latifolia</i>	К	кустарниковые заросли	Все лесистые районы	0.8-2.3
<i>E. verrucosa</i>	К	кустарниковые заросли	Все лесистые районы	0.6-2.1
Corylaceae				
<i>Carpinus betulus</i>	Д	субальпийские редколесья	Зангезур, Мегри	1.2-2.4
Elaeagnaceae				
<i>Hippophae rhamnoides</i>	Д	субальпийские редколесья	Все лесистые районы	0.6-2.3
Ericaceae				
<i>Rhododendron caucasicum</i>	К	субальпийские кустарниковые заросли	отсутствует	1.8-3.0
Fabaceae				
<i>Astragalus aureus</i>	К	лугостепные ценозы	везде	1.0-2.4
<i>A. lagurus</i>	К	лугостепные ценозы	везде	1.4-2.4
<i>A. microcephalus</i>	К	лугостепные ценозы	везде	0.7-2.6

1	2	3	4	5
<i>Onobrychis cornuta</i>	К	лугостепные ценозы	кроме Ширака	0.5-2.7
Fagaceae				
<i>Fagus orientalis</i>	Д	субальпийские бучины	отсутствует	0.8-2.2
<i>Quercus macranthera</i>	Д	субальпийские дубняки	Повсюду, кроме Ширака	1.3-2.7
Grossulariaceae				
<i>Grossularia reclinata</i>	К	субальпийские кустарниковые заросли	все лесистые районы	2.0-2.2
<i>Ribes alpinum</i>	К	отсутствует	все лесистые районы	1.6-2.1
<i>R. biebersteinii</i>	К	отсутствует	все лесистые районы	1.6-2.2
<i>R. orientale</i>	К	отсутствует	все лесистые районы	1.2-2.3
Oleaceae				
<i>Fraxinus excelsior</i>	Д	субальпийские редколесья	Повсюду, кроме Ширака	0.6-2.4
Rhamnaceae				
<i>Rhamnus cathartica</i>	Д	субальп. кустарниковые заросли	езде, кроме Ширака	0.6-2.2
<i>R. depressa</i>	К	субальп. кустарниковые заросли	отсутствует	1.8-2.8
<i>R. microcerpa</i>	К	субальп. кустарниковые заросли	отсутствует	1.8-2.3
Rosaceae				
<i>Amelanchier ovalis</i>	К	субальп. кустарниковые заросли	езде, кроме Ширака	1.8-2.2
<i>Cotoneaster integerrimus</i>	К	субальп. кустарниковые заросли	езде, кроме Ширака	0.9-2.4
<i>B.melanocarpus</i>	К	субальп. кустарниковые заросли	езде, кроме Ширака	0.9-2.8
<i>C.multiflorus</i>	К	субальп. кустарниковые заросли	Дар., Мегри	1.4-2.6
<i>C.suavis</i>	К	субальп. кустарниковые заросли	кроме Ширака	0.6-2.3
<i>Malus orientalis</i>	Д	субальп. кустарниковые заросли	кроме Ширака	0.5-2.5
<i>Padus avium</i>	Д	субальпийские редколесья	Дар., Занг., Мегри	0.7-2.4
<i>Prunus divaricata</i>	Д	субальпийские редколесья	кроме Ширака	0.4-2.3
<i>Pyrus salicifolia</i>	Д	субальпийские редколесья	кроме Ширака	0.6-2.2
<i>Rosa canina</i>	К	кустарниковые заросли	кроме Ширака	0.7-2.2
<i>Rubus idaeus</i>	Н К	кустарниковые заросли	все лесистые районы все районы	1.8-2.8
<i>Sorbus aucuparia</i>	Д	субальпийские редколесья	все лесистые районы все районы	1.6-2.8
<i>Spirae acrenata</i>	К	кустарниковые заросли	езде, кроме Ширака	0.7-2.2
<i>S. hypericifolia</i>	К	кустарниковые заросли	езде, кроме Ширака	1.2-2.5
Salicaceae				
<i>Populus tremula</i>	Д	суб. криволесья	все лесистые районы	1.2-2.4
<i>Salix aegyptiaca</i>	Д	суб. криволесья	езде, кроме Ширака	1.5-2.0
<i>S. alba</i>	Д	суб. криволесья	езде, кроме Ширака	0.6-2.2
<i>S. caprea</i>	Д	суб. криволесья	езде, кроме Ширака	1.5-2.3
<i>S. excelsa</i>	Д	суб. криволесья	езде, кроме Ширака	0.7-2.2
<i>S. pentandroides</i>	Д	суб. криволесья	езде, кроме Ширака	1.6-2.3
<i>S. purpurea</i>	К	кустарниковые заросли	лесистые районы	1.1-2.2

1	2	3	4	5
Thymelaceae				
<i>Daphne glomerata</i>	К	кустарниковые заросли	Лесистые районы	1.8-2.5
<i>D. mezereum</i>	К	кустарниковые заросли	Лесистые районы	1.6-2.4
<i>D. transcaucasica</i>	К	кустарниковые заросли	Лесистые районы	1.4-2.4
Ulmaceae				
<i>Ulmus glabra</i>	Д	субальпийские редколесья	Лесистые районы	1.3-2.3
Vacciniaceae				
<i>Vaccinium myrtillus</i>	К	кустарниковые заросли	отсутствует	2.2-3.2

Из указанного состава хвойных всего лишь 2 вида (*Pinus kochiana*, *Juniperus hemisphaerica*), остальные 50 видов лиственные.

Как показывают приведенные в табл.2 данные, состав дендрофлоры исследуемого региона довольно бедный по сравнению с другими дендрофлористическими районами республики, что вполне закономерно, т.к. эта зона является верхним и неблагоприятным пределом распространения древесных растений.

Таблица 2. Таксономический и биоморфный спектр древесных растений субальпийской зоны (Лорийский и Иджеванский флористические районы)

Семейство	Число таксонов				
	род	вид	В том числе по жизненным формам		
			Д	К	К _г
Cupressaceae	1	1		1	
Pinaceae	1	1	1		
Aceraceae	1	1	1		
Betulaceae	1	3	3		
Caprifoliaceae	2	2		2	
Celastraceae	1	2		2	
Corylaceae	1	1	1		
Elaeagnaceae	1	1	1		
Ericaceae	1	1		1	
Fabaceae	2	4		4	
Fagaceae	2	2	2		
Grossulariaceae	2	4		4	
Oleaceae	1	1	1		
Rhamnaceae	1	3		3	
Rosaceae	9	13	4	8	1
Salicaceae	2	7	5	2	
Thymelaceae	1	3		3	
Ulmaceae	1	1	1		
Vacciniaceae	1	1		1	
	32	52	20	31	1

Ведущим семейством как по числу родов, так и по числу видов является Rosaceae, включающее 9 родов и 13 видов. Относительно богато представлено сем. Salicaceae – 7 видов.

Биоморфным анализом выявлено, что в таксономическом составе дендрофлоры деревья представлены 20 видами (38,2%), кустарники – 31 (60%), полукустарники – 1 видом (1,8%). Древесные лианы практически отсутствуют, т.к. они как сравнительно термофильные и мезофильные представители древесной раститель-

ности, распространены и приурочены в определенных, более доступных микроклиматических ущельях нижнего и среднего лесного пояса данного региона.

Проведен также анализ дендрофлоры по группам величин деревьев и кустарников. Показано, что почти все виды как деревьев, так и кустарников низкорослые и образуют субальпийские криволесья (*Betula litwinowii*, *B. pendula*, *Salix caprea*, *Sorbus aucuparia* и др.).

На основе сравнительного анализа богатства дендрофлор субальпийской зоны различных лесорастительных регионов Армении показано (табл. 3), что во всех случаях в указанных дендроклиматических условиях число видов древесных растений колеблется от 40 до 52, подавляющее большинство которых (представители родов *Betula*, *Spiraea*, *Sorbus* и др.) встречается во всех районах, однако высотные пределы их распространения в большинстве случаев не совпадают.

Таблица 3. Сравнительная характеристика дендрофлор субальпийской зоны различных лесорастительных регионов Армении

Лесорастительный регион (флористический район)	Число таксонов					
	семейство		род		вид	
	общее	в суб. зоне	общее	в суб. зоне	общее	в суб. зоне
Северо-восточная Армения (Лорийский и Иджеванский районы)	45	19	86	32	165	52
Бассейн оз. Севан (Севанский район)	28	11	50	22	115	40
Бассейн р. Арпа (Даралегисский район)	36	14	75	29	186	15
Юго-восточная Армения (Зангезурский и Мегринский районы)	44	17	101	37	255	49

В составе современной дендрофлоры республики, в частности исследуемой территории северо-восточной Армении, сосредоточены реликты различного происхождения, основное ядро составляют виды из представителей полтавской, тургайской и средиземноморской флор. В этом отношении дендрофлору Армении, согласно Сосновскому [14], можно представить как местное ядро, обогащенное миграциями от мелового периода и олигоцена до наших дней.

Изучением реликтов занимались многие ботаники – крупные знатоки флоры Кавказа и Армении [6, 12]. В некоторых работах этих авторов территория Южного Закавказья в связи с содержанием реликтов делится на две части: южную (более ксерофильную), находящуюся в пределах Армено-Иранской флористической провинции, и северную (более мезофильную), находящуюся под влиянием Кавказской провинции. В северных районах республики, по данным Варданяна [3], основные представители реликтов не поднимаются выше 1000-1200м над ур. моря и представлены фрагментарно в ущельях рек Дебед, между ст. Айрум и Ахтала (*Hedera helix*, *Smilax excelsa*), Ахстев и Ахум (*Corylus colurna*, *Smilax excelsa*, *Staphylea pinnata*, *Taxus baccata*, *Acer laetum*, *Hedera helix* и др.).

В исследуемых древесных ценозах региона встречаются также многие реликты (*Daphne glomerata*, *D. transcaucasica*, *Rhododendron caucasicum*, *Vaccinium myrtillus* и др.). Общее число реликтов в составе дендрофлоры Армении представлены 31 видом из 29 родов [4], подавляющее большинство которых, как редкие и исчезающие занесены в Красную книгу растений Армении [19]. Что касается эндемиков, то они представлены в Армении довольно богато – больше 30 видов (около 10% дендрофлоры), подавляющее их большинство представители сем. Rosaceae

(*Pyrus, Rosa, Rubus, Crataegus* и др.), которые распространены главным образом в юго-восточных аридных регионах Армении [3, 4].

Обобщая результаты проведенных нами исследований, можно заключить, что дендроклиматические условия субальпийской зоны северо-восточной Армении не очень благоприятны для жизнедеятельности большинства представителей аборигенной дендрофлоры. Поэтому в этой зоне древесные растения представлены чрезвычайно бедным составом (52 вида) и отличаются крайне низкой (IV) величиной. Немногочисленные низкорослые и иногда кривоствольные деревья (представители родов *Betula, Acer, Sorbus, Salix* и др.) не образуют полноценные и производительные древостои, а формируют реликтовые дендроценозы единичными экземплярами или небольшими группами. Как показывают наши многолетние наблюдения, эти дендроценозы в суровых климатических условиях, находящиеся под постоянным антропогенным воздействием, не развиваются и не расширяют занимаемые площади.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамян А.Г. Верхний предел лесов северных районов Армении и причины его обуславливающие. Сб.тр. научн. раб. МСХ Арм.ССР, Ереван, с. 212-217, 1957.
2. Варданян Ж.А. Вертикальная распространенность дендрофлоры Армении. Биолог. журн. Армении, 42, 3, с. 207-213, 1989.
3. Варданян Ж.А. Деревья и кустарники Армении в природе и культуре. Ереван, 365, с. 2003.
4. Варданян Ж.А. Научные основы интродукции древесных растений в Армении. Изд. "Гитутюн" НАН РА, 398 с., 2012.
5. Варданян Ж.А. Дендрологические особенности верхнего и нижнего пределов распространения древесных растений в Армении. Доклады, АН РА, 115, 1, с. 69-77, 2015.
6. Гроссгейм А.А. Растительный покров Кавказа. М., 1948, 264 с.
7. Гулисашвили В.З. Особенности роста древесных растений у верхнего и нижнего пределов распространения. Лесоведение, 3, с. 37-43, 1976.
8. Дендрофлора Кавказа. Тбилиси, тт 1-5, 1959-1970.
9. Долуханов А.Г. Верхние пределы леса и субальпийский пояс в горах Кавказа. В кн.: "Высокогорная геоэкология". М., с. 46-49, 1976.
10. Дылис Н.В. Изучение лесных биогеоценозов. В кн.: Программа и методика биогеоцен. исслед. М., с. 281-317, 1974.
11. Корчагин А.А. Строение растительных сообществ. В кн.: Полевая геоботаника. Л., 5, с. 5-320, 1976.
12. Мулкиджанян Я.И. К истории арборифлоры Армянской ССР. В сб. научн. тр. Арм. отд. ВБО, с. 120-146, 1975.
13. Соколов С.Я., Связева О.А., Кубли В.А. Арёалы деревьев и кустарников СССР. Л., тт 1-3, 1977-1986.
14. Сосновский Д.И. Основные формы растительного покрова Кавказа в их географическом размещении. Сов. Бот., 15, с. 318-328, 1947.
15. Сукачев В.Н., Дылис Н.В. Основы лесной биогеоценологии, М., 574 с., 1964.
16. Сукачев В.Н., Зонн С.В. Методические указания к изучению типов леса. М., 144 с., 1961.
17. Флора Армении. Под ред. А.Л. Тахтаджяна, Ереван, тт 1-10, 1954-2001.
18. Хуриудян П.А. Лесопокрываемость Армении в историческом прошлом, современное состояние и уязвимость лесных сообществ при изменении климата. Сборник статей, Ереван, с. 110-122. (на арм. яз.), 1999.
19. Red Book of Plants of the Republic of Armenia. Higher Plants and Fungi. Tamanyan K., Fayvush G., Nanagulyan S., Danielyan T. (eds.) Second edition: Yerevan. 598p., 2010.

Поступила 26.09.2017



Biolog. Journal of Armenia, 1 (70), 2018

IN VITRO AND IN VIVO INFLUENCE OF PLANT PREPARATIONS ON DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV AND ADENOSINE DEAMINASE ACTIVITIES

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

H.Buniatian Institute of Biochemistry of Armenian NAS
biochem@ipia.sci.am

Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) and adenosine deaminase (ADA) are multifunctional enzymes, involved in different physiological processes. Often a problem of their regulation appears. Particularly, the inhibition of both enzymes considered beneficial at type 2 diabetes. This work describes the influence of ethanol extracts and constituents from several plants on DPPIV and ADA activities. The IC_{50} values of extracts from pellicles of walnut kernel, rose petals, melilot, leaves of pistacia, grape, sorrel and blackberry in the *in vitro* inhibition of ADA from bovine lung were in the range of 0.23-1.25 mg/ml. In inhibition of DPPIV from bovine kidney, the IC_{50} values of the extracts from blackberry leaves, pellicles of walnut kernel and rose petals were between 0.13 and 0.63 mg/ml. The IC_{50} values of phenol glycoside fractions from rose petals and grape leaves in DPPIV inhibition (0.029 mg/ml) were by one order smaller than for ADA (0.34 mg/ml). In the *in vivo* experiments, the increasing of ADA and DPPIV activities in the blood plasma of the streptozotocin injected rats (40 mg/kg of body weight) was proved. In these animals the extract from walnut kernel pellicles effectively inhibited the activities of both enzymes.

Adenosine deaminase–dipeptidyl peptidase IV– enzymatic activity regulation– plant extracts

Դիպեպտիդիլպեպտիդազ IV-ը (ԴՊՊ IV) և ադենոզինդեամինազը (ԱԴԱ) բազմաֆունկցիոնալ ֆերմենտներ են, ներգրավված տարբեր ֆիզիոլոգիական պրոցեսներում: Բազմաթիվ պաթոլոգիաներում գրանցվել է դրանց ակտիվության աճ: Ուստի, հաճախ ֆերմենտների կարգավորման խնդիր է առաջանում, մասնավորապես, 2-րդ տիպի շաքարախտի ժամանակ: Այս աշխատանքում նկարագրվում է որոշ բույսերի էթանոլային թուրմերի և բաղադրիչների ազդեցությունը նշված ֆերմենտների վրա: Ցուլի թոքի ԱԴԱ-ի ակտիվության *in vitro* ընկճման ժամանակ իշառվույտի, ընկույզի միջուկի թաղանթի, վարդի ծաղկաթերթիկների, պիստակի, խաղողի, ավելուկի և մոշի տերևների թուրմերի IC_{50} արժեքները գտնվում էին 0.23-1.25 մգ/մլ տիրույթում: Մոշի տերևների, ընկույզի միջուկի թաղանթի, վարդի ծաղկաթերթիկների թուրմերով ցուլի երիկամների ԴՊՊIV-ի արգելակման IC_{50} արժեքները 0.13-0.63 մգ/մլ միջակայքում էին: Վարդի ծաղկաթերթիկների և խաղողի տերևների ֆենոլագլիկոզիդային ֆրակցիաների IC_{50} արժեքները ԴՊՊIV-ի դեպքում (0.029 մգ/մլ) մեկ կարգով ավելի փոքր էին, քան ԱԴԱ-ի դեպքում (0.34 մգ/մլ): Հաստատվել է ստրեպտոզոտոցին ներարկված (40 մգ/կգ կենդանու կշիռ) առնետների արյան պլազմայում ԴՊՊIV-ի և ԱԴԱ-ի ակտիվության աճը: Այս կենդանիների մոտ ամենաարդյունավետ *in vivo* արգելակիչ հանդիսացավ ընկույզի միջուկի թաղանթի թուրմը:

Ադենոզինդեամինազ – դիպեպտիդիլպեպտիդազ IV – ֆերմենտային ակտիվության կարգավորում – բուսական թուրմեր

Дипептидилпептидаза IV (ДППИВ) и аденозиндезаминаза (АДА) –многофункциональные ферменты, вовлеченные в различные физиологические процессы. При ряде патологий наблюдается значительное увеличение их активности. Вследствие этого часто возникает необходимость ингибирования активности этих ферментов. В частности, желателен ингибирование ДППИВ и АДА при сахарном диабете второго типа. В данной работе представлено воздействие этанольных экстрактов и компонентов некоторых растений на активности ДППИВ и АДА. Значения IC_{50} при *invitro* ингибировании активности АДА из легких быка экстрактами донника лекарственного, пленки ядра грецкого ореха, лепестков розы, листьев фисташкового дерева, винограда, конского щавеля и ежевики находились в пределах 0.23-1.25 мг/мл. IC_{50} экстрактов пленки ореха, листьев ежевики и лепестков розы при *invitro* ингибировании ДППИВ из почек быка находились в пределах 0.13-0.63 мг/мл. Значения IC_{50} для фенолгликозидов из лепестков розы и листьев винограда в случае ДППИВ (0.029 мг/мл) были на порядок меньше, чем для АДА (0.34 мг/мл). В опытах *invivo* подтверждено возрастание активности ДППИВ и АДА в плазме крови экспериментальных крыс после инъекции стрептозотоцина (40 мг/кг веса). У этих животных активность обоих ферментов наиболее эффективно подавлял экстракт пленки орехового ядра.

Аденозиндезаминаза – дипептидилпептидаза IV – регулирование ферментативной активности – растительные экстракты

Adenosine deaminase (ADA, E.C. 3.5.4.4) catalyzes deamination of (deoxy)adenosine (Ado) and plays a critical role in maturation and differentiation of lymphoid cells, maintaining the effective immune, neurological and vascular systems [4]. Two molecular forms of ADA are as follows: a small, intracellular SADA, and a large LADA, formed as a complex of SADA and DPPIV/CD-26 [6]. The located on the cell membranes and circulating LADA catalyzes deamination of Ado in the intercellular medium. Adenosine receptors (ARs) were also identified as ADA anchoring proteins leading to activation of T-cells [5]. The costimulatory effects promoted by the ADA-DPPIV/CD26 complex consist in the inducing of IL-6 production, INF- γ and TNF- α secretion, enhancing the pro-inflammatory response [16].

A multifunctional dipeptidyl peptidase IV (DPPIV; EC 3.4.14.5) is a ubiquitous and unique serine protease removing N-terminal dipeptides from the polypeptides and proteins, containing proline or alanine on the penultimate position. This enzyme truncates many cytokines, chemokines and peptide hormones. It is identical to CD26, an antigen of activated human T lymphocytes, involved in regulatory and co-stimulatory events in the immune system [3, 10]. The clinical studies of the role of DPPIV and of the specific inhibitors paved the way to novel therapeutic concepts in many pathologies such as diabetes [22]. The membrane-bound form of DPPIV is expressed in many tissues on T-, B-, natural killer, hematopoietic progenitor and stem cells and macrophages. The soluble form of DPPIV is circulating in blood plasma and is detected in urine, bile, semen, cerebrospinal, pleural and synovial fluids [3, 10].

The described importance of concerted and individual functions of DPPIV and ADA in humans, their association with different vital systems forced to study of the ways of their regulation. Particularly, this problem concerns the diabetes mellitus.

The glucagon-like peptide-1 (GLP-1) (7-36) is insulinotropic incretin hormone and a most potent therapeutic agent for treatment of type 2 diabetes (T2D). However, DPPIV converted it to inactive GLP-1(9-36) [7] and the inhibition of DPPIV is one of the strategies to prolong its antidiabetic activity [9]. At present, the inhibitors of DPPIV are under development in preclinical and clinical studies, and several of them are marketed as anti-diabetic drugs [17]. As it is known, the serum level of ADA in T2D patients was increased reliably [12]. It was elevated in the streptozotocin-injected rats.

The increase of ADA can result in decreasing of the Ado level and in development of insulin resistance [18].

The detection of natural inhibitors of DPPIV and ADA could be beneficial for treatment of T2D. There is preclinical evidence for the efficacy of plants as hypoglycemic agents or in the management of diabetic complications [8]. Medicinal herbs contain diverse bioactive compounds having positive effects on insulin production. Metformin, a first line drug for T2D, is based on a biguanide compound from the antidiabetic French lilac [2].

Earlier, we demonstrated the inhibition of DPPIV and ADA activities by aqueous extracts from Armenian Highland plants [13]. The transmission and scanning electron microscopy study [11] proved the ability of the ethanol extract of rose petals and of its phenole glycoside fraction to hinder the fibrillation of peptide hormone of pancreas, amylin (one of the causes of T2D development). The decreasing of amylin aggregation and the *in vitro* protection of islet β -cells from death in the presence of aggregated amylin by the ethanol extracts and fractions from several plants were demonstrated [20, 21]. These results prove the probability of usefulness of herbal constituents in prevention and treatment of T2D.

This work describes the *in vitro* and *in vivo* influence on DPPIV and ADA activities of ethanol extracts from several plants and their constituents. For study, we used the plants which traditionally are used in folk medicine and/or as food in Armenian cousin, but are not studied by researchers before.

Materials and methods. The leaves of grape (*Vitisvinifera*), sorrel (*RumexConfertus*), pistacia (*Pistacia atlanticaDesf.*) and blackberry (*RubusCaesius*), rose petals (*Rosa damascena*), aerial parts of melilot (*Melilotusofficinalis*) and walnut (*Juglansregia*) were collected from Armenian Highland and dried in the shade. A voucher specimen has been deposited in the herbarium of the Botanical Department of Yerevan State University (Dr. NarineZaqaryan). The ethanol extract preparation, identification of constituents, fractionation by gel-filtration and characterization of fractions by chemical analyses, thin layer chromatography and optical absorbance in UV-Vis region are described earlier [1].

For *in vitro* experiments, ADA and DPPIV were purified from bovine lung and kidney, respectively [14, 19]. In the assay of their activities, Ado and Gly-Pro p-nitroanilide toluenesulfonate salt, purchased from Sigma Ltd. USA, were used as substrates.

In the *in vivo* experiment, 30 laboratory rats were divided to six groups. One of them was kept as untreated control. In 25 animals T2D model was induced by injection of streptozotocin (STZ, AppliChem GmbH, Germany) in dose of 40 mg/kg of body weight. One group was kept as STZ-control. The animals of four groups were fed orally three times per a week with the ethanol extracts from walnut kernel pellicles (WP), rose petals (RP), leaves of grape (GL) and sorrel (SL), indose of 400 mg/kg of body weight. This dose was chosen as most suitable after preliminary testing of doses between 150-400 mg/kg. In four weeks, per 1 ml of blood was taken cardiopunctually using heparinized syringe. DPPIV and ADA activitis wereassayed in the blood plasma.

Data analyses were performed using the statistical software InStat, version 3 for Windows (GraphPad Software, Inc., SanDiego, CA, USA). Specific differences were tested using Student's two-tailed *t*-test. The data showing $P < 0.05$ were considered as statistically authentic. Results were expressed as mean $\pm$ s.e.m.

Results and Discussion. The *in vitro* effects of plant preparations on the activities of DPPIV and ADA, purified from bovine kidney and lung, respectively, were studied. From the concentration dependences, the IC_{50} values of the ethanol extracts and isolated fractions from plants in inhibition of DPPIV and ADA were estimated (tab. 1). These data evidence that IC_{50} values of the extracts from WP, pistacia and blackberry leaves in inhibition of two enzymes are in mutual conformity. IC_{50} in inhibition of DPPIV by

extract from RP is by one order smaller than in the case of ADA. The extracts from melilot, SL and GL influenced on the activities of two enzymes differently. Their IC_{50} values in the case of ADA are in line with the other extracts, but these three extracts did not inhibit DPPIV. Moreover, the extract from melilot somewhat activated DPPIV.

Table 1. IC_{50} values of plant preparations in inhibition of DPPIV and ADA activities

$IC_{50}, \text{mg/ml} \pm \text{s.e.m.}$			
ethanol extract from:		ADA	DPPIV
1	walnut kernel pellicles	0.23 ± 0.005	0.20 ± 0.01
2	pistacia leaves	0.29 ± 0.014	0.39 ± 0.03
3	grape leaves	0.36 ± 0.03	>100
4	melilot	0.57 ± 0.014	Light activation
5	sorrel leaves	0.68 ± 0.06	>100
6	blackberry leaves	0.94 ± 0.09	0.63 ± 0.14
7	rose petals	1.25 ± 0.09	0.13 ± 0.01
Phenolglicoside fractions from:			
8	rose petals	0.33 ± 0.02	0.029 ± 0.005
9	grape leaves	0.35 ± 0.05	0.029 ± 0.003

The IC_{50} values of PhG from RP and GL in inhibition of the enzymes are very close one to other. In the case of DPPIV they were by one order smaller of that for ADA. It should be noted that in the identical experiments, the PhGs and the emodine from SL did not affect the activity of DPPIV.

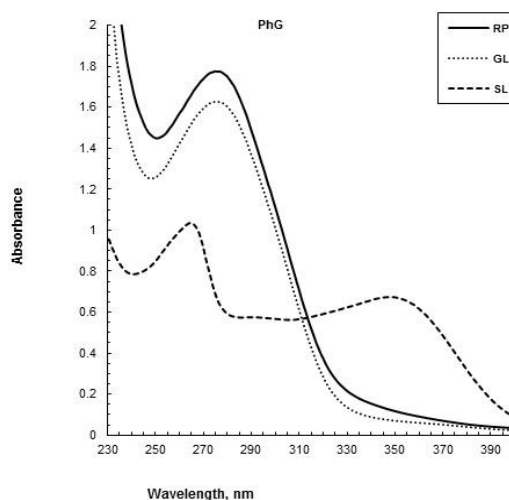


Fig. 1. The spectra of PhG fractions from RP, GL and SL.

Fig. 1 shows the optical absorption spectra of PhGs from three plants. It is interesting, that the spectrum of PhGs from SL, which did not affect the activity of DPPIV strongly differs from the spectra of PhGs from RP and GL, which inhibited DPPIV with close effectivity ($IC_{50} = 0.029 \text{ mg/ml}$). Obviously, the constituents of the last two chemically differ from those of PhG from SL. Comparison with the literature data [15] evidence that the spectra of GL and RP PhGs are similar to the spectra of the tannins' class flavon-3-ole ((+) – catechin)s. The absorbance of SL PhG is characteristic for monomeric flavonols and oligomeric procyanidins, the absorption band at 320-350 nm evidences the involvement of phenol oxides, flavonones and flavananes.

The dependences of DPPIV activity on the concentration of GL PhG were investigated at two concentrations of the substrate. The graphical analyses manifested the competitive nature of inhibition with K_i equal to 1.35 $\mu\text{g/ml}$.

The *in vivo* effects of the water suspensions of dried ethanol extracts from WP (150 mg/kg of body weight), GL (300 mg/kg) and SL (400 mg/kg) on the activities of DPPIV and ADA in the plasma of healthy rats were studied. Three groups of normal laboratory rats, per three animals in each, were fed with these extracts for 4 weeks (twice in a week). The doses were chosen taking into account their IC_{50} values in the *in vitro* inhibition of ADA (0.23 mg/ml < 0.36 mg/ml < 0.68 mg/ml, tab. 1).

The fourth group served as a control. In the end of the experiment, the activities of ADA and DPPIV were determined in the blood plasma of animals. In fig. 2, A and B the results, expressed in percentage of the control animals, are presented. The activity of ADA in the groups, fed with plant extracts, was lower than in the control group, but this decreasing was not in the accordance with their *in vitro* IC_{50} values. The activity of DPPIV in the groups, fed with plant extracts, was higher than in the control. In spite of low IC_{50} value of the extract from WP (0.20 mg/ml, tab. 1), DPPIV activity in the group, which received this extract, was the highest.

Hence, the *in vivo* influences of three ethanol extracts on the ADA and DPPIV activities in blood plasma of healthy rats were strongly different and were not in the accordance with the *in vitro* inhibition of the enzymes.

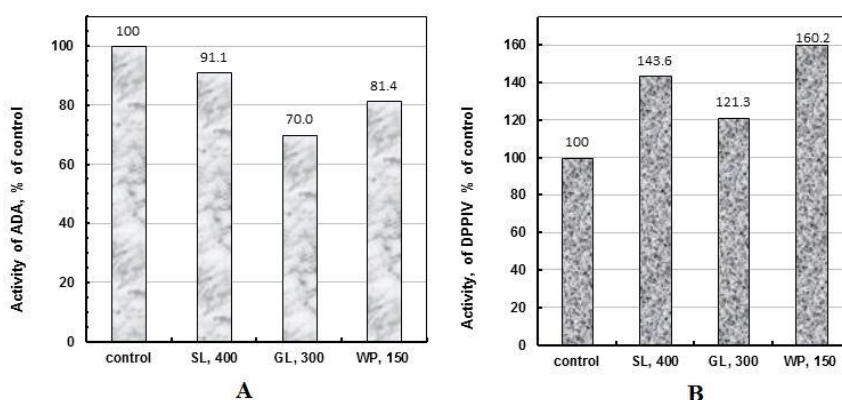


Fig.2. Activities of ADA (A) and DPPIV (B) in the blood plasma of healthy rats, fed for 4 weeks with the water suspensions of the ethanol extracts from WP, GL and SL.

In the next experiments, the *in vivo* effects of STZ and herbal extracts on the activities of DPPIV and ADA were studied. Four groups of STZ-injected animals were fed orally in the dose of 400 mg/kg of body weight for a month by the ethanol extracts from:

- RP, which *in vitro* effectively inhibited DPPIV ($IC_{50} = 0.13 \pm 0.01$ mg/ml), but slightly inhibited ADA ($IC_{50} = 1.25 \pm 0.09$ mg/ml);
- GL, which *in vitro* inhibited ADA ($IC_{50} = 0.36 \pm 0.03$ mg/ml), but did not influence on the DPPIV activity ($IC_{50} > 100$);
- WP, which *in vitro* inhibited both ADA ($IC_{50} = 0.23 \pm 0.005$ mg/ml) and DPPIV ($IC_{50} = 0.20 \pm 0.01$ mg/ml);
- SL which *in vitro* moderately inhibited ADA ($IC_{50} = 0.68 \pm 0.06$ mg/ml), but did not influence on the activity of DPPIV ($IC_{50} > 100$ mg/ml).

At the end of the experiment, DPPiV and ADA activities were determined in the blood plasma. Table 2 shows the ADA activities in 6 animal groups: untreated, STZ-control and 4 groups, which received the plant extracts. The data are presented in the percentage of the activity in the group of untreated animals. In accordance with the literature data [12], the activity of ADA in the blood of animals in the STZ-control group increased relative to the untreated group by 42 % ($P < 0.05$). In the STZ-injected animals, which received the ethanol extracts from WP, RP, SL and GL, the ADA activity was inhibited *in vivo* moderately, down to 60-80 % of the untreated group ($P > 0.05$). These values are significantly lower of that in STZ-control group and consist 45-55 % of it ($P < 0.05$).

Table 2. The activity of ADA in 6 animal groups

Group	untreated	STZ-cont	RP, 400	GL, 400	WP, 400	SL, 400
% of control $\pm$ s.e.m.	100 $\pm$ 9.1	142 $\pm$ 12.03	73 $\pm$ 7.6	78 $\pm$ 8.3	64 $\pm$ 12.3	73 $\pm$ 8.0
P vs untreated		* $P < 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$
P vs STZ-cont			* $P < 0.05$	* $P < 0.05$	* $P < 0.05$	* $P < 0.05$

Tab.3 shows the activities of DPPiV in the same groups. The activity of DPPiV in the STZ-control group is higher of that in the untreated animals by 24 % ($P < 0.05$). In the animals, fed by the extracts from GL and SL, which did not inhibit DPPiV *in vitro* (tab. 1), the DPPiV activities were close to that in the STZ-control group. Surprisingly, in the group, fed by the extract from RP with the best *in vitro* inhibition ($IC_{50} = 0.13$ mg/ml), the *in vivo* activity was higher than in STZ-control group.

Table 3. The activity of DPPiV in 6 animal groups

Group	untreated	STZ-cont	RP, 400	GL, 400	WP, 400	SL, 400
% of control $\pm$ s.e.m.	100 $\pm$ 4.3	124 $\pm$ 3.9	138 $\pm$ 3.8	106 $\pm$ 3.7	70 $\pm$ 10.1	123 $\pm$ 6.3
P vs untreated		* $P < 0.05$	** $P < 0.01$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$
P vs STZ-cont			$P > 0.05$	$P > 0.05$	** $P < 0.01$	$P > 0.05$

Only in the blood of animals, fed with the extract from the WP (*in vitro* $IC_{50} = 0.20$ mg/ml), DPPiV activity was inhibited statistically significantly, down to 56 % of the STZ-control group ($P < 0.01$).

The IC_{50} values of several plant extracts (and two PhG fractions) evidenced moderate and significant values in inhibition of ADA *in vitro*. Their capabilities to inhibit DPPiV *in vitro* were different.

In the healthy animals, the ADA activity under action of some of the studied ethanol extracts *in vivo* was moderately lower of that in the control animals, but the activity of DPPiV was surprisingly higher than in the control animals.

Our study proved the increasing of ADA and DPPiV activities in the blood plasma of the STZ-injected animals. In the STZ-injected animals fed by plant extracts, the ADA activity was inhibited *in vivo* significantly, down to 45-55 % of the STZ-injected animals ($P < 0.05$).

The extract from WP demonstrated one of the lowest IC_{50} values in inhibition of DPPiV *in vitro* (0.20 ± 0.01 mg/ml). In the *in vivo* study, it inhibited the activity of

DPPIV down to 56 % of the activity in the STZ-injected group ($P < 0.01$). This is the best effect observed in our study.

It is worthy to note, that the extract from WP demonstrated the lowest IC_{50} values for both enzymes (0.23 and 0.20 mg/ml for ADA and DPPIV respectively). In the *in vivo* experiment, this extract also demonstrated the best inhibition of ADA and DPPIV (down to 60 and 70 % of untreated or 45 and 56 % of STZ-control groups, respectively). We can conclude, that the active constituent(s) in this extract (contrary to those from RP) is (are) stable against the digestion processes in the animals and inhibited the enzymes *in vivo* rather effectively, in accordance with the *in vitro* inhibition. Hopefully, the obtained results will allow considering usefulness of some Armenian Highland plants in the treatment of diabetes mellitus as co-drugs.

Acknowledgment

This work was supported by State Committee Science MES RA, in the frame of the research project № SCS 15T-1F164.

REFERENCES

1. Antonyan A., Sharoyan S., Harutyunyan H., Movsisyan N., Sargisova Y., Stepanyan H., Mardanyan S. Cytotoxicity of some edible plants toward Ehrlich ascites carcinoma cells. *Research Journal of Medicinal Plant*. 8, 20-31, 2013.
2. Bailey C.J., Day C. Metformin: its botanical background *Practical Diabetes*, 21, 115-117, 2004.
3. Boonacker E., Van Noorden C.J.F. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *European Journal of Cell Biology*. 82, 53-73, 2003.
4. Chechik B.E., Schreder W.P., Minowada J. An immunomorphological study of adenosine deaminase distribution in human thymus tissue normal lymphocytes, and hematopoietic cell lines. *J. Immunol*. 126, 1003-1007 1981.
5. Chen J.F., Eltzschig H.K., Fredholm B.B. Adenosine receptors as drug targets—What are the challenges? *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 12, 265-286, 2013.
6. Dong R.P., Kameoka J., Hegen M., Tanaka T., Xu Y., Schlossman S.F., Morimoto C. Characterization of adenosine deaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in immune response. *J. Immunol*. 156, 1349-1355, 1996.
7. Drucker J.D. Enhancing Incretin Action for the treatment of Type 2 Diabetics. *Diabetes Care*. 26, 2929-2940, 2003.
8. Ezuruiken U. F., Prieto J. M. The use of plants in the traditional management of diabetes in Nigeria: Pharmacological and toxicological considerations. *J. Ethnopharmacology*. 155, 857-924, 2014.
9. Gadsby R. Efficacy and Safety of Sitagliptin in the Treatment of Type 2 Diabetes. *Clinical Medicine. Therapeutics*. 1, 53-62, 2009.
10. Gorrell M. D., Gysbers V., McCaughan G.W. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*. 54, 249-264, 2001.
11. Hovnanyan K., Sharoyan S., Antonyan A., Hovnanyan N., Mardanyan S. Effects of Extract and Phenol Glycoside from Rose Petals on the Amylin Fibrils. *Open Access Library Journal*, 4: e3343, 2017.
12. Khemka V. K., Bagchi D., Ghosh A, Sen O., Bir A., Chakrabarti S., Banerjee A. Raised Serum Adenosine Deaminase Level in Nonobese Type 2 Diabetes Mellitus. *The Scientific World Journal*. 1, 1-5, 2013.
13. Mardanyan S., Sharoyan S., Antonyan A., Zakaryan N. Dipeptidyl peptidase IV and adenosine deaminase inhibition by Armenian plants and antidiabetic drugs. *International Journal of Diabetes and Metabolism*. 19, 69-74, 2011.

14. *Mardanyan S., Sharoyan S., tonyan A., Armenyan A., Cristalli G., Lupidi G.* Tryptophan environment in adenosine deaminase. I. Enzyme modification with N-bromosuccinimide in the presence of adenosine and EHNA analogues. *Biochem. Biophys. Acta.* 1546, 185-195, 2001.
15. *Matti V.* Flavonoids and other phenolic compounds: characterization and interactions with lepidopteran and sawfly larvae. PhD thesis, University of Turku, Finland, 2014
16. *Pacheco R., Martinez-Navio J.M., Lejeune M., Climent N., Oliva H., Gatell J.M., Gallart T., Mallol J., Lluís C., Franco R.* CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 9583-9588, 2005.
17. *Rosenblum J., Kozarich J.* Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 496-504, 2003.
18. *Rutkiewicz J., Górski J.* On the role of insulin in regulation of adenosine deaminase activity in rat tissues. *FEBS Letters.* 271, 79-80, 1990.
19. *Sharoyan S., Antonyan A., Mardanyan S., Lupidi G., Cristalli G.* Influence of dipeptidyl peptidase IV on enzymatic properties of adenosine deaminase. *ActaBiochimicaPolonica,* 53, 539-546, 2006.
20. *Sharoyan S., Antonyan A., Mardanyan S., Harutyunyan H.* Inhibition of fibrillogenesis of amylin by the extracts of medicinal plants and their fractions. *Biological Journal of Armenia* 66, 13-19, 2014.
21. *Sharoyan S.G., Antonyan A.A., Harutyunyan H.A., Mardanyan S.S.* Inhibition of Amylin Fibril Formation and Protection of Islet β -Cells by Medicinal Plants. *International Journal of Pharmacognosy* 2, 234-241, 2015.
22. *Vilhauer E.B., Brinkman J.A., Naderi G.B., Burkey B.F., Dunning B.E., Prasad K., Mangold B.L., Russell M.E., Hughes T.E.* 1-[(3-Hydroxy-1-adamantyl)amino] acetyl]-2-cyano-(S)-pyrrolidine: a potent, selective, and orally bioavailable dipeptidyl peptidase IV inhibitor with antihyperglycemic properties. *J. Med. Chem.* 46, 2774-2789, 2003.

Received on 29.09.2017



Биолог. журн. Армении, 1 (70), 2018

ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИПОВ ХАРАКТЕРА СПОРТСМЕНОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПОЛИГРАФА

К.А. ПАНЧУЛАЗЯН*, А.А. АРУТЮНЯН**, М.Р. АСАТРЯН**

*Институт физиологии им. акад. Л. А. Орбели НАН РА,

**Государственный институт физической культуры и спорта Армении
kapan21@rambler.ru

Разработана адаптированная к специфике спорта интегральная модифицированная система психофизиологического определения типов характера спортсменов с применением полиграфа. Комплексный психофизиологический опрос с применением полиграфа позволяет выявлять индивидуальные биологические особенности, функциональные нарушения нервной системы и формировать положительную психофизическую мобилизационную готовность спортсменов. Кооперация полиграфологической регистрации неспецифических физиологических реакций организма с психофизиологическим определением типов характера спортсменов служит универсальным средством декодирования подсознательных невербальных элементов психики спортсменов.

Психофизиологическое исследование – компьютерный полиграф – полиграфологическая методика – индивидуальные психофизиологические особенности – типы характера – спортивная мобилизационная готовность

Մշակված է սպորտին յուրահատուկ ադապտացված, մարզիկների բնավորության տեսակների հոգեֆիզիոլոգիական որոշման ինտեգրալ մոդիֆիկացված համակարգ պոլիգրաֆի կիրառմամբ: Պոլիգրաֆի կիրառմամբ կոմպլեքսային հոգեֆիզիոլոգիական հարցումը թույլ է տալիս բացահայտել անհատական կենսաբանական առանձնահատկությունները, նյարդային համակարգի ֆունկցիոնալ խանգարումները և ձևավորել մարզիկների դրական հոգեֆիզիոլոգիական մոբիլիզացիոն պատրաստությունը: Օրգանիզմի անհատական ֆիզիոլոգիական ռեակցիաների պոլիգրաֆոլոգիական գրանցման կոոպերացիան մարզիկների բնավորության տեսակների հոգեֆիզիոլոգիական որոշմամբ ծառայում է որպես մարզիկների հոգեբանության ենթագիտակցական ոչ վերբալ տարրերի վերծանման ունիվերսալ միջոց:

Հոգեֆիզիոլոգիական հետազոտություն – կոմպլեքսային պոլիգրաֆ – պոլիգրաֆոլոգիական մեթոդ – անհատական հոգեֆիզիոլոգիական առանձնահատկություններ – բնավորության տեսակներ – մարզական մոբիլիզացիոն պատրաստություն

The integrated modified system of psycho-physiological determination of types of character of athletes with application of polygraph is developed by adapting to the specifics of the sport. Complex psycho-physiological survey using a polygraph allows us to identify individual biological features, functional disorders of the nervous system and forming positive psychophysical mobilization readiness of athletes. Cooperation of polygraph registration of nonspecific physiological reactions of the organism with a psycho-physiological definition of the types of character of athletes serves as a universal approach for decoding subconscious nonverbal elements of the psyche of athletes.

Psycho-physiological definition – computer polygraph – polygraphological method – individual psycho-physiological features – types of character – sporting mobilization readiness

Характер (гр. *character* отличительная черта, признак) – совокупность психофизиологических особенностей личности, проявляющихся в ее действиях, поведении. Индивидуализированность психосоциальной деятельности человека определяется его характером. Бессознательное и сознательное поведение зависит от генетически наследуемых анатомо-физиологических и фенотипически формируемых индивидуальных психофизиологических особенностей (ИПФО) индивида. По превларированию влияния наследственности или среды на организм определяется темперамент как генотип и характер как фенотип.

Если эмоционально-волевую сферу – темперамент составляют сила, подвижность и уравновешенность процессов возбуждения и торможения, то структурными компонентами характера являются экстра-, амбо- и интравертированность направленности поведенческих реакций и психосоциальных отношений личности [6, 11]. Одним из ведущих показателей характера выступает воля (лат. *voluntas*) – психофизиологическая способность индивида достигать поставленных им целей в условиях преодоления препятствий, в том числе спортивных [3].

АКТУАЛЬНОСТЬ связи типа характера спортсмена с особенностями его предстартовой мобилизационной готовности, необходимость ее всестороннего теоретического и экспериментального изучения очевидны. В тех видах спорта, где действие как бы “одноактно”, квантифицировать динамику психической напряженности спортсмена сложно. Более удобны для этих целей те виды спорта, где спортсмен неоднократно выходит на старт (например, в дзюдо, боксе или каратэ) для борьбы с различными по своей силе, технике и внутренней психофизиологической установке соперниками. Как правило, поединок выдерживает и побеждает не столько “силатехника-опыт”, относительно одинаковые у соперников, сколько наиболее гармонизирующий с видом спорта тренированный в борьбе стрессоустойчивый бойцовский индивидуальный “тип характера” (ТХ). Именно имеющий физиологическую потребность к соперничеству и готовый к продолжительной психологической борьбе спортивный ТХ соматотоника ставит последнюю точку в поединке.

Правильное определение ТХ спортсмена дает возможность тренеру продуктивно индивидуализировать его тактику и стратегию борьбы, а спортивному психофизиологу – при наличии соответствующих психофизиологических условий дать правильную психологическую установку мобилизации и распределения энергии в предстартовый и стартовый периоды, управление естественным эндострессом. Спортивная борьба начинается не с “пустого места”. Ей предшествует изменение психического состояния спортсмена на фоне характера, темперамента, опыта [13]. На базе профессионального сотрудничества Государственного института физической культуры и спорта Армении-ГИФКСА (Armenian State Institute of Physical culture and Sport-ASIPCS) и Института физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА в лаборатории психофизиологии человека проведено научно-практическое психофизиологическое исследование (ПФИ) с применением компьютерного полиграфа (КП) 15-ти студентов-спортсменов 2-х факультетов ГИФКСА по специальностям дзюдо, бокс, каратэ. Студенты 1-го и 2-го курсов факультетов спортивная педагогика и управление (СПУ) и физическое воспитание и оздоровительные технологии (ФВОТ) отбирались по принципу добровольности и представлению преподавателей ГИФКСА. Впервые на основе метода ZCT многофункционального КП LX-3000SW разработана и продуктивно применена адаптированная к специфике профессионального спорта модифицированная полиграфологическая методика психофизиологического определения (ПФО) ТХ по Юнгу [14, 15].

Адаптация полиграфологического метода к специфике профессионального спорта и ИПФО исследуемых осуществлялась качественно новой интегральной системой взаимодополняющих психофизиологических, психологических и полиграфо-

логических методик комплексного психофизиологического опроса (КПФО) студентов-спортсменов с применением КП. Интегральной системой КПФО задействованы неэкспериментальный (наблюдение, беседа, изучение и сравнительный анализ жизнедеятельности), экспериментальный (квантифицированная физиологическая регистрация функционального состояния организма в динамике эксперимента с применением КП) и экспертный (методика индивидуальной психодиагностики континуальных биологических особенностей организма) методы исследования. Определялся психофизиологический статус (ПФС) индивида по корреляции выявляемых типов личности, характера и темперамента, соционического (психоинформационный континуум) и физиологического компонентов. ТХ спортсменов определялись контрольной интегральной системой методик КПФО, затем опытной полиграфологической регистрацией адаптированным методом ZCT.

Материал и методика. ПФИ с применением КП на определение ТХ по Юнгу прошли 15 студентов-спортсменов 1-го и 2-го курсов в возрасте 18 – 20 лет трех специальностей ГИФКСА: 5 дзюдоистов, 5 боксеров и 5 каратэистов. Предваряя каждое ПФИ, параллельно над тестами проводилась подготовительная работа – адаптация теста к ИПФО исследуемого и теме исследования. В качестве технического оснащения в комплексном исследовании использовался КП LX-3000SW лицензированной Lafayette Instrument Company-LIC (Indiana 47903, USA) с программным обеспечением Polygraph LX Software V.8.1.1 и алгоритмом обчета результатов POLYSCORE®, который реализует количественный анализ физиологической информации на основе современного метода системы статистических сравнений Objective Scoring System (OSS) под управлением операционной системы Windows® [17]. По данным Applied Physics Laboratory (APL) Университета Джона Хопкинса (США), алгоритм POLYSCORE® обеспечивает достоверность интерпретации более 99% и позволяет полиграфологам достичь практически полного консенсуса в оценке точности ПФИ [1]. Физиологические сигналы от датчиков и блока сбора данных КП оцифровываются и хранятся на магнитных носителях высокой плотности. Система цифровой обработки данных OSS представляет эмпирическую основу результатов экспертной количественной оценки (ЭКО) и подтверждения достоверности результата автоматического компьютерного анализа (АКА) [5, 18]. Регистрировалось также изменение интегральных неспецифических вегетативных реакций организма в границах “норма – акцентуация – патология” в ответ на произвольное вербальное (семантическое) и произвольное невербальное (просодическое) раздражение [9]. ИПФО выявляются по флуктуации 5 каналов физиологических индикаторов интегральной реактивности организма – объема и частоты пульса (кардиоваскулярная реакция), электрокожного сопротивления-ЭКС (кожногальваническая реакция-КГР), респирации (грудного и диафрагмального дыхания) в процессе КПФО спортсмена. Все физиологические данные, одновременно отображенные и зарегистрированные АКА в ходе предыдущих ПФИ, воспроизводятся для ЭКО и интерпретации психофизиолога-полиграфолога [10, 12]. Полиграфологические тесты ПФИ адаптированы к специфике спортивных единоборств, ИПФО и интеллектуально-профессиональному уровню каждого студента-спортсмена.

Результаты и обсуждение. Количественный сравнительный анализ полученной физиологической информации на основе метода системы цифровой обработки экспериментальных данных OSS показал общую вероятность типа характера (OBTX) методом ZCT алгоритма POLYSCORE® LIC: интровертивному ТХ соответствует интервал <1 – 5 %, амбовертивному ТХ – интервал 5 – 95 % и экстравертивному ТХ – интервал 95 – >99 %.

Полиграфологическим методом ZCT из 5 дзюдоистов, 5 боксеров и 5 каратэистов интровертивный ТХ определен у 3 дзюдоистов и 2 каратэистов (OBTX 1 – 5 %), экстравертивный ТХ – у 2 дзюдоистов, 4 боксеров и 2 каратэистов (OBTX 97 – >99 %), средний эквивалентный амбовертивный ТХ – у 1 боксера-правши с силь-

ным левым кроссом (встречный удар, пересекающий путь бьющей руки противника) и у 1 каратэиста (ОВТХ 35 – 48 %).

С целью сохранения конфиденциальности базы персональных данных (БПД) ГИФКСА и оперативной работы с результатами тест-анализа с применением КП идентификация личности, порядковый номер в таблице 1, файл полиграфа (ФП) и результаты ПФИ каждого исследуемого закодированы в условные обозначения: дзюдо – J (01 – 05), бокс – В (01 – 05) и каратэ – К (01 – 05).

В табл. 1 представлены результаты ПФО ТХ по Юнгу с применением КП 15 студентов-спортсменов ГИФКСА факультетов СПУ и ФВОТ.

Таблица 1. ПФО ТХ по Юнгу с применением КП 15 студентов-спортсменов

N	ФП	ФИО, вид спорта	ГР	Фак-ет, курс	Специальность	ВК (кг)	ТХ (по Юнгу)	ОВТХ (%)
1	0021	J 01	1998	СПУ, 1	Дзюдо, 1 KYU	73	Интроверт.	5
2	0022	J 02	1999	ФВОТ, 1	Кинез-ия, 1 KYU	90	Экстраверт	99
3	0023	J 03	1999	СПУ, 1	Дзюдо, 1 DAN	55	Экстраверт	97
4	0024	J 04	1998	СПУ, 2	Дзюдо, 1 KYU	60	Интроверт.	2
5	0025	J 05	1997	СПУ, 2	Дзюдо, 6 KYU	66	Интроверт.	1
6	0026	В 01	1998	СПУ, 1	Бокс	56	Экстраверт	>99
7	0027	В 02	1999	СПУ, 1	Бокс	60	Экстраверт	99
8	0028	В 03	1998	СПУ, 1	Бокс	64	Экстраверт	99
9	0029	В 04	1999	СПУ, 1	Бокс	56	Амбоверт.	48
10	0030	В 05	1999	СПУ, 1	Бокс	81	Экстраверт	>99
11	0031	К 01	1998	СПУ, 1	Каратэ, 1 DAN	60	Амбоверт.	35
12	0032	К 02	1997	СПУ, 1	Каратэ, 3 KYU	73	Интроверт.	2
13	0033	К 03	1999	СПУ, 1	Каратэ, 1 DAN	70	Экстраверт	99
14	0034	К 04	1999	СПУ, 1	Каратэ 1 DAN	67	Экстраверт	99
15	0035	К 05	1998	СПУ, 1	Каратэ, 1 KYU	64	Интроверт.	2

Условные обозначения, аббревиатуры и пояснения.

ФП – файл полиграфа.

ФИО – фамилия, имя, отчество.

J (01 – 05) – дзюдоисты, В (01 – 05) – боксеры, К (01 – 05) – каратэисты.

ГР – год рождения.

СПУ – Спортивная педагогика и управление (факультет).

ФВОТ – Физическое воспитание и оздоровительные технологии (факультет).

ВК – весовая категория (в кг).

ТХ – тип характера (по К. Юнгу).

ОВТХ – общая вероятность типа характера (в %).

Дополнительно результаты полиграфологического тест-анализа ТХ по Юнгу позволяют также определить особенности характера в рамках типа темперамента по Айзенку [3]. Согласно особенностям ТХ в рамках типа темперамента (ТТ) по айзенку: интровертивному ТХ соответствует меланхолический или флегматический ТТ, экстравертивному ТХ соответствует холерический или сангвинический ТТ, а среднему эквивалентному амбовертивному ТХ ближе устойчивый (эмоционально стабильный) флегматический ТТ [16]. Это не значит, что представители одного ТТ будут похожи друг на друга как близнецы. Могут не совпадать их характеры, возраст или образование, но в аналогичных, например стрессовых ситуациях, они будут действовать похожим образом, опираясь на свои ведущие, хорошо развитые психические функции. В табл. 2 представлены те же 15 студентов-спортсменов с особенностями характера в рамках ТТ по Айзенку.

Таблица 2. Особенности характера студентов-спортсменов в рамках ТТ по Айзенку.

Неустойчивый (эмоционально лабильный)			
	J 05		
	J 01	B 01	
Интровертивный	Меланхолический	Холерический	Экстравертивный
	Флегматический	Сангвинический	
	J 04	J 02	
	B 04	J 03	
	K 01	B 02	
	K 02	B 03	
	K 05	B 05	
		K 03	
		K 04	
Устойчивый (эмоционально стабильный)			

Полиграфологическое ПФИ объективизирует субъективное психологическое тестирование (ПТ), выявляет скрытые сердечно-сосудистые, психоэмоциональные, респираторные заболевания, акцентуации и функциональные обратимые психические отклонения. Достоверное знание ТХ спортсмена позволяет тренерам и преподавателям максимально продуктивно работать в унисон на индивидуальной “биологической частоте” спортсмена для: 1) преодоления эндогенных психологических барьеров, 2) формирования психоплетики в стрессогенных ситуациях, 3) поддержания положительной спортивной мотивации, 4) выработки рефлекса лидера и 5) психофизической функциональной предстартовой мобилизационной готовности (МГ), иначе “стартовой готовности” по Левитову [7]. На базе выявленного ТХ гармоничное психосовмещение психосоциального этноменталитета спортсмена и философии восточных единоборств тренерам дает возможность кумулировать вектор долгосрочной борьбы на татами и добиваться победных результатов. Состояние фоновой МГ создается спортсменом продолжительное время сознательно и целенаправленно, и уровень этого состояния в большей степени определяется его характером, личным опытом и спортивной мотивацией в настоящее время. При этом происходит мобилизация сил участника соревнования для выполнения именно данной деятельности. Наряду с характером предстоящей деятельности большое влияние на его формирование оказывает отношение спортсмена к данному действию [8]. Поскольку эти силы должны быть использованы в необходимый момент, то структура психических и физиологических процессов и функций стартовой МГ должна быть на наиболее оптимальном для данного вида спорта уровне.

ПФИ с применением КП позволяет выявлять акцентуации личности, проводить психодиагностику функциональных нарушений нервной системы (стрессы, острые и хронические депрессии, неврозы спортивной этиологии). А также психотренинг пролонгированной положительной спортивной мотивации и психокоррекцию постстрессовых психоэмоциональных и психосоматических состояний спортсменов после тяжелых побед, поражений, спортивных травм и реактивацию иммунитета к спортивным экстремальным экзо- и эндогенным раздражителям методикой биологической обратной связи (БОС). Повышение стрессоустойчивости, поддержание положительной предстартовой спортивной мотивации и формирование пролонгированного предстартового функционального психофизического состояния МГ.

Была выявлена корреляция между ТХ, как компонента ПФС индивида, и положительной или отрицательной психоэмоциональной спортивной мотивацией спортсмена в предстартовый период. ТХ спортсмена определенно влияет на успешность его спортивной деятельности посредством мотивационных характеристик личности.

ПФО ТХ необходимо также для выявления компонента психоинформационной корреляции личности, определяющего ведущие способы энергоинформационного обмена (принятия, обработки, передачи) информации психикой, например: экстравертивный рациональный (логический или этический); интровертивный иррациональный (интуитивный или сенсорный); амбовертивный (логико-сенсорный интроверт или интуитивно-этический экстраверт). Этот соционический “информационный метаболизм” – отражение структурных различий особенностей восприятия и мышления людей, а также анализ того, каким образом проявляются эти структуры в склонностях, способностях и поведенческих реакциях [4]. Зная особенности реагирования и взаимодействия с окружающей средой спортсмена, возможно определять сильные и слабые стороны, прогнозировать функциональное изменение организма и поведение в тренировочном процессе, на учебно-тренировочных сборах, а также поддерживать положительную спортивную мотивацию в период предстартовой МГ методом психофизиологического тренинга с применением КП.

Таким образом, ПФО ТХ по Юнгу с применением КП позволяет оперативно с высокой достоверностью многосторонне исследовать спортсмена как личность в ее анатомо-физиологическом, интеллектуально-профессиональном и психосоциальном проявлении. Компьютерный тест-анализ с применением полиграфа является многосторонней достоверной системой объективного психофизиологического определения индивидуальных психофизиологических особенностей и типов характера спортсменов. Полиграфологическое определение типов характера спортсменов оперативно определяет качественный вектор работы тренеров в эмпирическом процессе выявления скрытых компонентов личности спортсменов и повышении результативности тренировок. Комплексный психофизиологический опрос с применением полиграфа позволяет регистрировать одновременно несколько неспецифических физиологических реакций психоэмоционального предстартового состояния организма и обосновывать положительную или отрицательную динамику спортивной мотивации. Полиграфологический тест-анализ предстартового состояния позволяет выявлять адекватную и неадекватную (нормальные или патологические эмоциональные реакции на соревнование) спортивную мотивацию спортсменов и мобилизационную готовность. Психофизиологическое исследование с применением полиграфа позволяет оперативно выявлять функциональные нарушения нервной системы спортивной этиологии и проводить восстановительную регуляцию психоэмоционального и психосоматического состояния организма методом биологической обратной связи. Контрольные данные психофизиологического исследования с применением полиграфа позволяют корректное проведение индивидуального и группового психологического тренинга спортсменов с целью поддержания положительной спортивной мотивации и стабилизации психофизической стартовой мобилизационной готовности. Полиграфологическое исследование обнаруживает адекватность (правду) или неадекватность (ложь) неспецифических физиологических реакций организма с произвольными вербальными ответами в комплексном психофизиологическом опросе.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Азарова Н.Ю., Журнов С.И., Корочкин П.Б.* Обзор методик полиграфных проверок США. Ред. Коровина В.В., Изд-во ЦИПТ “ЭКСПЕРТ”, М., 2013.
2. *Айзенк Г.Ю.* Структура личности. С.-Пб.: Ювента; М., КСП+, с. 464, 1999.
3. *Арутюнян А.А.* Психофизиологические основы спортивной подготовки. Ред. Испирян М.С., Изд-во ГИФКСА, Ереван, с. 24-26, 2004.
4. *Аугустинавичюте А.* Соционика (в 2-х томах). Том 1: Введение. Том 2: Психотипы. Тесты, С.-Пб., Изд-во “Terra Fantastica”, с. 56-79, 1998.
5. *Варламов В.А., Варламов Г.В., Комиссарова Я.В.* Составление заключений по материалам психофизиологических исследований. М., 2009.
6. *Коробков А.В.* Нормальная физиология. М., Изд-во “Высшая школа”, с. 408-410, 1980.
7. *Левитов Н.Д.* Психическое состояние беспокойства, тревоги. М., Просвещение, 1, с. 38-45, 1969.
8. *Левитов Н.Д.* Психология характера. М., Просвещение, 424 с., 1969.
9. *Панчулазян К.А.* Неспецифические реакции организма на эквивалентные уровни акустической энергии. Вестник МАНЭБ, 10, 5, 2, с. 175-177, 2005.
10. *Панчулазян К.А.* Психофизиологическое исследование персонала с применением полиграфа. 21-й век НОФ “Нораванк”, 37, 4, с. 95-104, 2015.
11. *Петровский А.В., Ярошевский М.Г.* Психология. М., Политиздат, 1990, С. 459 – 461.
12. *Сошников А.П.* Оценка персонала. Психологические и психофизиологические методы. М., ЭКСМО, с. 27-33, 2010.
13. *Узнадзе Д.Н.* Общая психология. М., Изд-во “Смысл”, 413 с., 2010.
14. *Юнг К.Г.* Мышление у экстравертов и интровертов. Хрестоматия по общей психологии. Психология мышления. Ред. Ю.Б. Гиппенрейтер, В.В. Петухова. М., Изд-во МГУ, с. 391-398, 1981.
15. *Юнг К.Г.* Аналитическая психология. С.-Пб., 1994.
16. *Eysenck H.J.* The biological basis of personality. Springfield: 400 p., 1967.
17. *Harwell E.M.* A comparison of 3- and 7- Position Scoring Scales with Field Examinations. Polygraph, 29, 2, с. p. 195-197, 2000.
18. *Matte J.A.* Psychological Structure and Theoretical Concept of the Backster Zone Comparison Technique. Polygraph. 36, 2, p. 84-90, 2007.

Поступила 12.10.2017



Биолог. журн. Армении, 1 (70), 2018

НЕИДЕНТИЧНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ И СУПЕРОКСИД-ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ИЗОФОРМ NADPH ОКСИДАЗЫ И СУПРОЛА ИЗ ВЕНОЗНОЙ И ПЛАЦЕНТАРНОЙ КРОВИ I-IV ГРУПП ЧЕЛОВЕКА

Р.М. СИМОНЯН¹, М.А. БАБАЯН¹, Г.М. СИМОНЯН¹ А.В. АРУТЮНЯН²,
Р.А. АБРААМЯН², М.А.СИМОНЯН¹

¹ Институт биохимии им. Г.Х.Бунятыана НАН РА

² Институт перинатологии, акушерства и гинекологии МЗ РА
maxim.simonyan@gmail.com

С использованием открытого недавно процесса избирательного комплексообразования гемоглобина с изоформами NADPH оксидазы (Nox) и гемоглобин-индуцирующего релизинга изоформ Nox из биомембран в растворимую фазу была выделена высокоочищенная и нативная суммарная фракция изоформ Nox1+Nox2 из эритроцитарных мембран, экстрацеллюлярная Nox и O₂⁻-продуцирующий липопроtein высокой плотности – супрол, из сыворотки плацентарной и венозной крови I-IV групп человека. Удельное содержание и O₂⁻-продуцирующая активность этой прооксидантной системы плацентарной крови выше венозной, особенно крови у IV группы. В I-IV группах венозной и плацентарной крови наблюдаются неидентичные изменения уровня, оптических спектральных индексов и O₂⁻-продуцирующей активности вышеуказанной прооксидантной системы. Фактически такое увеличение прооксидантного статуса плацентарной крови необходимо для нормального развития плода. Полученные данные могут считаться новыми отличительными факторами между венозной и плацентарной кровью I-IV групп.

Группа крови I-IV – NADPH оксидаза – супрол – супероксидный радикал

Օգտագործելով վերջերս բացահայտված՝ հեմոգլոբինի և ՆԱԴՓՈ օքսիդազի (Nox) իզոմերների միջև առկա ընտրողական կոմպլեքսագոյացման և կենսաթաղանթներից Nox-ի իզոմերների՝ դեպի լուծելի ֆազ հեմոգլոբինով հարուցված արտագոյացման գործընթացը, մարդու երակային և ընկերային I-IV խմբերի արյան էրիթրոցիտների թաղանթներից անջատվել են բարձր մաքրությամբ և նատիվությամբ օժտված Nox1+Nox2-ի գումարային ֆրակցիան, արյան շիճուկից՝ արտաբջջային Nox և սուպերօքսիդ-գոյացնող ու բարձր խտություն ունեցող լիպոպրոtein – սուպրոլ: Այդ պրոօքսիդանտային համակարգի տեսակարար քանակությունը և O₂⁻-ի գոյացման ակտիվությունը ընկերային արյան մեջ ավելի բարձր է, քան երակային արյան մեջ, հատկապես IV խմբում: Մարդու երակային և ընկերային I-IV խմբերի արյան մեջ դիտվում են նշված պրոօքսիդանտային համակարգի մակարդակի, օպտիկական սպեկտրային ինդեքսների ու O₂⁻-ի գոյացման ակտիվության ոչ նույնանման փոփոխություններ: Փաստորեն ընկերային արյան մեջ պրոօքսիդանտային կարգավիճակի աճն անհրաժեշտ է պտղի նորմալ աճի համար: Բերված տվյալները կարող են հանդիսանալ որպես երակային և ընկերային I-IV խմբերի արյան նոր տարբերակիչ գործոններ:

Արյան խմբեր I-IV – ՆԱԴՓՈ օքսիդազ – սուպրոլ – սուպերօքսիդ ռադիկալ

Using the recently discovered process of selectively complex formation of the hemoglobin with isoforms of NADPH oxidase (Nox), localized in the surface layers of biomembranes and hemoglobin induced releasing of the isoforms of Nox to the soluble phase, the highly purified and total fraction of native Nox1+Nox2 from erythrocytes membranes, extracellular Nox and O₂⁻-producing

lipoprotein from serum of the I-IV group of human venous and placental bloods are isolated. The specific content and O_2^- -producing activity of these prooxidative systems in placental blood is higher in comparison with venous blood, especially in IV group. In I-IV group of human venous and placental blood the nonidentical changes of the level, the optical spectral index and O_2^- -producing activity of these prooxidative system is observed. In fact, the increase of prooxidative status of the placental blood for the normal development of the baby is required. These changes can be considered a new distinctive feature between I-IV group of human venous and placental blood.

Blood group I-IV – NADPH oxidase – suprol – superoxide radical

Известно, что основные отличия между группами крови связаны с наличием агглютининов (а и b) и агглютиногенов (А и В). С выделением новой прооксидантной системы сыворотки крови человека – NADPH содержащего, O_2^- -продуцирующего липопротеина высокой плотности (супрола) [6], экстрацеллюлярной NADPH оксидазы (eNox) из сыворотки крови [9], а также суммарной фракции изоформ Nox (Nox1+Nox2) из эритроцитарных мембран [8], появилась возможность для комплексного определения и сравнения удельного содержания, O_2^- -продуцирующей активности изоформ Nox и супрола из венозной и плацентарной крови человека I-IV групп. С использованием открытого недавно процесса избирательного комплексообразования между изоформами Nox с гемоглобином, изоформы Nox выделяются не только из клеточных мембран и мембран внутриклеточных формирований, но и из мембранных формирований наночастиц – экзосом сыворотки крови (eNox) [3]. Супрол и приведенные изоформы Nox претерпевают характерные количественные и качественные изменения при различных патологических состояниях и заболеваниях в эксперименте и клинике (злокачественные новообразования, диабет, интоксикация тяжелыми металлами и т.д.) [2]. За счет продуцируемых O_2^- прооксидантная система регулирует иммунную систему, экспрессию гена, митохондриальное дыхание, кислородный гомеостаз, пролиферацию и апоптоз клеток и другие важные процессы аэробного метаболизма [1]. Однако к настоящему времени в литературе отсутствуют данные об изменениях приведенной прооксидантной системы, регуляторов метаболизма активного кислорода в сыворотке венозной и плацентарной крови I-IV групп человека. Определение этих показателей может по новому характеризовать факторы различия между группами венозной и плацентарной крови человека.

Целью работы являлось нахождение различий между группами венозной и плацентарной крови I-IV групп, ассоциированные с характерными изменениями уровня и активности супрола, eNox и суммарной фракции изоформ Nox1+Nox2, выделенных из приведенных групп крови.

Материал и методика. Свежеабранную донорскую и плацентарную кровь (по 20 мл) I-IV групп в отдельности стабилизировали 2 %-ным цитратом натрия с 0,9 %-ной глюкозой.

Выделение сыворотки и эритроцитов. Сыворотку и эритроциты выделяли методом осаждения центрифугированием [8]. После осаждения эритроцитов путем центрифугирования крови при $5500 \times g$, сыворотку отделяли. После промывания осажденных эритроцитов 0,9 %-ной NaCl (1:40 об/об) и повторного центрифугирования в аналогичных условиях осевший на поверхности осажденных эритроцитов белый слой плазменных элементов удаляли. Далее эритроциты смешивали с физраствором (1:500 об/об) и после самоосаждения последних при $4^\circ C$ удаляли верхний слой раствора, а эритроциты собирали центрифугированием в приведенных условиях. После гемолиза эритроцитов в воде (1:20 об/об) и осаждения эритроцитарных мембран (ЭМ) центрифугированием гемолизата при $13000 \times g$ в течение 15 мин ЭМ промывали 0,04 М калий-фосфатным буфером (КФБ, pH 7,4) до получения бесцветного супернатанта. Сыворотку крови дополнительно центрифугировали для удаления следов осажденных эритроцитов.

Выделение фракции изоформ Nox1+Nox2 из ЭМ. Из ЭМ суммарную фракцию нативных изоформ Nox1+Nox2 выделяли путем ионообменной хроматографии фракции этих

белков на целлюлозе DE-52 ("Whatman", Англия). Денатурирующие агенты (ультразвук, перекись водорода и детергент) не применялись. В процессе использовали избирательное комплексообразование между гемоглобином и локализованными на поверхностных слоях биомембран изоформами Nox. Суммарная фракция изоформ Nox из колонки DE-52 элюировали 0,1 М КФБ, pH 7,4 [8].

Выделение суммарной фракции изоформ экстрацеллюлярной Nox1+Nox2 из сыворотки крови. Суммарную фракцию изоформ Nox (Nox1+Nox2) из мембранных формирований наночастиц экзосом, локализованных в сыворотке крови, выделяли приведенным лицензированным способом. После инкубации (при 37°C, в течение часа, при pH 7,4) сыворотки крови с 10^{-5} М ферригемоглобина и центрифугирования супернатант подвергали ионообменной хроматографии на колонке с сефадексом DEAE-50 (3×8 см). Суммарную фракцию eNox элюировали 0,04 М КФБ и подвергали ионообменной хроматографии на целлюлозе DE-52 [8].

Выделение фракции супрола из сыворотки крови и его активирование. Супрол из сыворотки крови выделяли путем осаждения фракции этого НАДРН содержащего липопротеина высокой плотности добавлением FeCl_3 (10^{-6} М) с дальнейшим центрифугированием при $5800 \times g$ 10 мин. При этом ионы Fe^{+3} активируют супрол, переводя электрон от НАДРН в составе супрола к молекулярному кислороду, превращая его в O_2^- [6].

Определение количества изоформ Nox и супрола. Удельное содержание суммарной фракции изоформ eNox и супрола из сыворотки крови и суммарной фракции изоформ Nox ЭМ (после их обессоливания и вакуумной лиофилизации) определяли в расчете на 1 мг/мл сыворотки и 1 мг/мл эритроцитов соответственно.

Определение O_2^- -продуцирующей активности изоформ Nox и супрола. O_2^- -продуцирующую активность изоформ Nox определяли методом нитротетразолиевого синего (НТС) [2] с добавлением к реакционной смеси 10 мкМ динатриевой соли NADPH. При определении O_2^- -продуцирующей активности супрола динатриевая соль NADPH к реакционной смеси не добавляется, так как в составе молекулы супрола уже имеется достаточное количество эндогенного NADPH [6]. При этом 1М O_2^- восстанавливает 1М НТС, превращая его в 1М формазана. За единицу O_2^- -продуцирующей активности принимается то количество изоформ Nox или супрола, которое вызывает 50 %-ное увеличение плотности максимального оптического поглощения образовавшегося формазана при 560 нм. Удельная O_2^- -продуцирующая активность изоформ Nox и супрола была определена в расчете на 1 мг приведенных белков (ед/мг).

Оптические спектры поглощения регистрировались на спектрофотометре "Specord UV/VIS" (Германия) с длиной оптического пробега 1 см при комнатной температуре.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по Стьюденту, с определением критерия достоверности "р" ($M \pm m$). Число опытов 6 ($n=6$).

Результаты и обсуждение. Приведенным лицензированным способом из мембранных формирований наночастиц – экзосом сыворотки и жидкости асцитных карцином получают нативные и высокоочищенные (95-96 %) изоформы суммарной фракции Nox1+Nox2 [4] и Nox из ЭМ венозной и плацентарной крови I-IV групп. За счет NO^* , локализованного в лигандном окружении железа гемовой группы изоформ Nox [5, 10, 11, 14], ферригемоглобин избирательно образует нитрозогемоглобиновый комплекс с этими Nox, локализованными на поверхностных слоях различного характера клеточных мембран и мембран внутриклеточных формирований млекопитающих (митохондрии, ядра, микросомы и наночастицы) Nox. После такого комплексообразования наблюдается гемоглобин-индуцированный релизинг (отщепление) этих Nox из гетерогенной фазы (из биомембран) в растворимую. С другой стороны, при получении изоформ Nox не используются денатурирующие изоформы Nox агенты (перекись водорода, детергент и ультразвук) [8, 9, 13, 14], как это имеет место при широко распространенном иммуноэлектрофоретическом методе Western-Blotting [3, 4, 11-13].

Таким образом, полученные нами изоформы Nox более нативны и получаются в аналитических и препаративных целях в течение всего 4-5 ч, что немаловажно для исследования приведенных слабостабильных мембранных белков.

Оптические спектры поглощения суммарной фракции изоформ Nox1+Nox2 из ЭМ венозной и плацентарной крови I-IV групп приведены на рис.1.

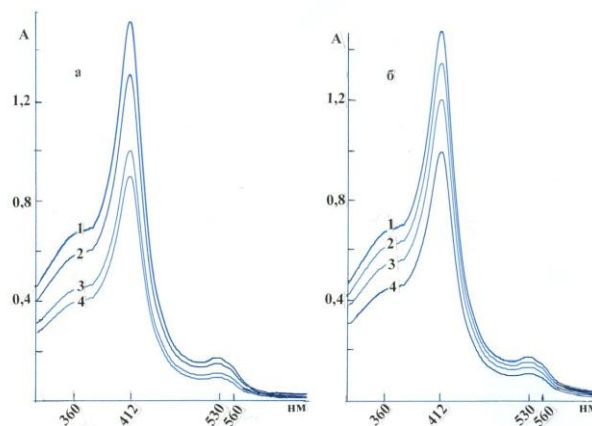


Рис.1. Оптические спектры поглощения суммарной фракции изоформ Nox1+Nox2 из ЭМ венозной (а) и плацентарной (б) крови I-IV групп. Белки растворены в 0,1М КФБ, рН 7,4.

В окисленном состоянии и после восстановления дитионитом натрия суммарной фракции изоформ Nox1+Nox2 из мембран эритроцитов I-IV групп венозной и плацентарной крови по форме и максимумам характерных оптических поглощений не отличаются (рис.1-2).

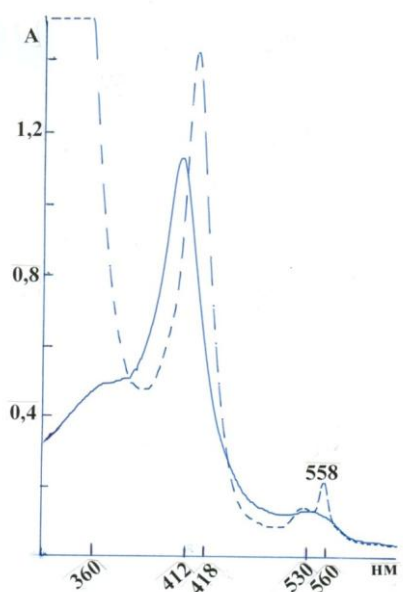


Рис.2. Форма оптических спектров поглощения суммарной фракции изоформ Nox1+Nox2 из венозной и плацентарной крови I-IV групп в окисленном состоянии (—) и после их восстановления дитионитом натрия (----) на примере изоформ Nox1+Nox2 из ЭМ I группы крови (показатели изоформ Nox остальных групп претерпевают такие же изменения и не приводятся).

Как показано на рис. 3, по форме и максимумам характерных оптических поглощений изоформы суммарной фракции Nox1+Nox2 из мембран экзосом сыворотки I-IV групп венозной и плацентарной крови в окисленном состоянии (—) и после восстановления дитионитом натрия (----) не отличаются.

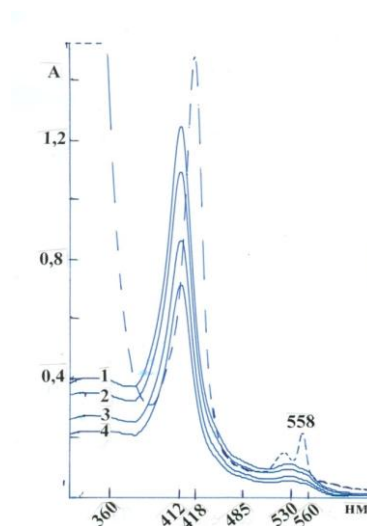


Рис.3. Форма оптических спектров поглощения суммарной фракции изоформ экстрацеллюлярной Nox1+Nox2 из сыворотки венозной и плацентарной крови I-IV групп (1-4) в окисленном состоянии (—) и после их восстановления дитионитом натрия (----). Изоформы Nox растворены в 0,04 М КФБ, pH 7,4.

По форме оптические спектры поглощения супрола из сыворотки венозной и плацентарной крови I-IV групп крови не отличаются. Однако супролы из сыворотки плацентарной крови I-IV групп практически полностью растворяются в 0,04 М КФБ, в отличие от супрола сыворотки венозной крови приведенных групп. В случае сыворотки венозной крови растворимость супрола сохраняется в течение 2 сут, далее происходит самоагрегация и потеря растворимости супрола практически без потери O_2^- -продуцирующей активности (рис. 4).

Удельное содержание (мг/мл эритроцитов) суммарной фракции изоформ Nox1+Nox2 из ЭМ I-IV групп несколько отличаются друг от друга. Их удельное содержание несколько выше в ЭМ II и IV групп венозной и плацентарной крови (табл.1).

Эта закономерность практически не наблюдается для суммарной фракции изоформ Nox1+Nox2 из сыворотки венозной и плацентарной крови. Их удельное содержание также выше у изоформ eNox из плацентарной крови (табл.2).

Неидентично изменяется удельное содержание супрола из сыворотки венозной и плацентарной крови I-IV групп (табл. 3). На фоне снижения уровня супрола из сыворотки венозной крови I, II и IV групп, в III группе наблюдается существенное повышение удельного содержания супрола из сыворотки плацентарной крови IV группы (табл. 3).

Удельная O_2^- -продуцирующая активность суммарной фракции изоформ Nox1+Nox2 из ЭМ венозной и плацентарной крови изменяется в разных пределах, и эта активность выше у изоформ Nox из ЭМ IV группы, особенно плацентарной крови (табл. 4).

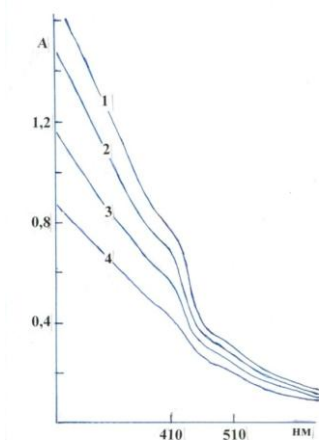


Рис.4. Оптические спектры поглощения свежеполученной фракции супероксида из сыворотки плацентарной крови I-IV групп человека (1-4). Аналогичные данные получают и для супероксида из сыворотки венозной крови I-IV групп человека и не приводятся. Фракции супероксида растворены в 0,04 М КФБ, pH 7,4.

Таблица 1. Удельное содержание (мг/мл эритроцитов) суммарной фракции изоформ Nox1+Nox2 из ЭМ венозной и плацентарной крови I-IV групп, $p < 0,05$, $n = 6$.

Источники суммарной фракции изоформ Nox1+Nox2	I	II	III	IV
ЭМ венозной крови	$0,10 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,015$	$0,18 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,01$
ЭМ плацентарной крови	$0,14 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,012$

Таблица 2. Удельное содержание (мг/мл сыворотки) суммарной фракции изоформ экстрацеллюлярной Nox1+Nox2 из сыворотки венозной и плацентарной крови I-IV групп человека, $p < 0,05$, $n = 6$.

Источники суммарной фракции изоформ Nox1+Nox2	I	II	III	IV
Сыворотка венозной крови	$0,02 \pm 0,003$	$0,015 \pm 0,002$	$0,010 \pm 0,001$	$0,023 \pm 0,001$
Сыворотка плацентарной крови	$0,031 \pm 0,003$	$0,028 \pm 0,002$	$0,035 \pm 0,001$	$0,044 \pm 0,002$

Таблица 3. Удельное содержание (мг/мл сыворотки) фракции супероксида из сыворотки венозной и плацентарной крови I-IV групп, $p < 0,05$, $n = 6$.

Источники фракции супероксида	I	II	III	IV
Сыворотка венозной крови	$0,11 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,003$	$0,08 \pm 0,005$	$0,07 \pm 0,004$
Сыворотка плацентарной крови	$0,15 \pm 0,001$	$0,13 \pm 0,001$	$0,14 \pm 0,002$	$0,22 \pm 0,003$

Таблица 4. Удельная O_2^- -продуцирующая активность (ед/мг) суммарной фракции изоформ Nox1+Nox2 из ЭМ венозной и плацентарной крови I-IV групп, $p < 0,05$, $n = 6$.

Источники продуцирования O_2^-	I	II	III	IV
Фракция Nox1+Nox2 из ЭМ венозной крови	$47,4 \pm 5,1$	$78,2 \pm 6,3$	$62,4 \pm 4,3$	$82,7 \pm 7,1$
Фракция Nox1+Nox2 из ЭМ плацентарной крови	$56,4 \pm 3,9$	$88,2 \pm 7,7$	$71,6 \pm 5,4$	$93,8 \pm 7,9$

Динамика изменения удельной O_2^- -продуцирующей активности суммарной фракции изоформ Nox1+Nox2 из сыворотки венозной и плацентарной крови человека I-IV групп (ед/мг) также различна. Эта активность сравнительно выше у суммарной фракции eNox из сыворотки плацентарной крови IV группы (табл. 5).

Таблица 5. Удельная O_2^- -продуцирующая активность суммарной фракции изоформ Nox1+Nox2 из сыворотки венозной и плацентарной крови I-IV групп (ед/мг) $p < 0,05$, $n = 6$.

Источники продуцирования O_2^-	I	II	III	IV
Суммарная фракция изоформ Nox1+Nox2 из сыворотки венозной крови	83,4±7,3	140,2±10,0	139,4±11,2	155,7±12,3
Суммарная фракция изоформ Nox1+Nox2 из сыворотки плацентарной крови	92,4±9,1	160,2±14,3	170,6±14,1	191,8±15,3

На этом фоне наблюдается увеличение удельной O_2^- -продуцирующей активности супрола (ед/мг) из сыворотки венозной и плацентарной крови I-IV групп (табл. 6), которая намного выше у супрола из плацентарной крови.

Таблица 6. Удельная O_2^- -продуцирующая активность супрола (ед/мг) из сыворотки венозной и плацентарной крови человека, $p < 0,05$, $n = 6$.

Источники продуцирования O_2^-	I	II	III	IV
Супрол из сыворотки венозной крови	160±10,2	174±11,1	195±14,3	211±21,0
Супрол из сыворотки плацентарной крови	210±19,2	218±19,9	230±22,3	280±25,1

Таким образом, в подавляющем большинстве уровень и O_2^- -продуцирующая активность прооксидантной системы плацентарной крови выше, чем венозной, особенно крови IV группы. Фактически такое увеличение прооксидантного статуса крови необходимо для нормального развития плода.

Можно заключить, что наряду с общеизвестными различиями между I-IV группами крови, в подавляющем большинстве случаев наблюдаются неидентичные изменения уровня и O_2^- -продуцирующей активности прооксидантной системы (изоформы Nox ЭМ, eNox и супрол из сыворотки).

Полученные данные могут рассматриваться в качестве новых отличительных черт венозной и плацентарной крови I-IV групп.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексанян М.К., Симонян Г.М., Алексанян Серг.С., Симонян Р.М., Ширинян В.С., Алексанян С.С., Симонян М.А., Степанян Г.М. Вопросы. Повышение уровня экстрацеллюлярной NADPH оксидазы в асцитной карциноме легких человека. Вопросы. Теорет. клин. мед., 15, 1, с. 10-12, 2012.
2. Мелконян Л.Г., Алексанян А.С., Симонян Р.М., Симонян Г.М., Бабалян М.А., Секоян Э.С., Симонян М.А. Влияние двуокиси углерода на уровень и активность изоформ NADPH-оксидазы in vitro и ex vivo. Медицина, Наука и Образование, 9, 8-12, 2011.
3. Симонян Г.М., Алексанян С.С., Алексанян А.С., Степанян А.А., Бабалян М.А., Симонян М.А. Различная степень релизинга изоформ цитохрома b_{558} из эритроцитарных мембран и комплексобразования гемоглобина с цитохромом b_{558} . Мед. наука Армении, XLIV, 3, 47-50, 2004.

4. *Симонян Г.М., Григорян Г.Г., Симонян Р.М., Симонян М.А.* Высокая резистентность сывороточных цитохромов b_{558} против перекиси водорода по сравнению с другими гемопротеинами. В кн. Актуальные вопросы военной медицины. Сборник статей ЕрГМУ им М. Гераци, Ереван, 48-51, 1999.
5. *Симонян Г.М., Симонян Р.М., Бабаян М.А., Симонян М.А., Галоян А.А.* ФАД и углеводные остатки в составе ЭМ цитохрома b_{558} III, его NADPH-зависимая O_2^- -продуцирующая активность и ЭПР спектральные характеристики. Мед. наука. Армении, XLIII, 1, 30-34, 2003.
6. *Симонян М.А., Карапетян А.В., Бабаян М.А., Симонян Р.М.* NADPH-содержащая супероксид-продуцирующая липопротеиновая фракция из сыворотки крови, выделение, очистка, краткие характеристики и механизм действия. Биохимия, 61, 5, 932-938, 1996.
7. *Симонян Р.М.* Механизмы оксидативного повреждения клеток тканей млекопитающих и защитные факторы (обзор). Теорет. Клин.Мед., 19, 3, 41-49, 2016.
8. *Симонян Р.М., Симонян Г.М., Симонян М.А.* Способ выделения изоформ NADPH оксидазы (Nox) из биосистем. Лицензия изобретения агентства индивидуальной собственности РА N2818 А, Ереван, 2014.
9. *Симонян Р.М., Ширинян С.В., Бабаян М.А., Алексанян А.С., Симонян Г.М., Григорян А.Ф., Алексанян С.С., Симонян М.А.* Активность, степень отщепления и комплексообразование с ферригемоглобином изоформ NADPH оксидазы из эритроцитарных мембран и экзосом сыворотки пациентов, носителей рака желудка. Биолог. журн. Армении, Приложение 66,1, 83-88, 2014.
10. *Jonathan S. Stamler, Li Jia, Jerry P. Eu, Timothy J. McMahon, Ivan T. Demchenko, Joseph Bonaventura, Kim Gernert, Claude A. Piantadosi* Blood Flow Regulation by S-Nitrosohemoglobin in the Physiological Oxygen Gradient. *Science*, 276, 5321, 2034-2037, 1997. *Karen Bedard, Karl-Heinz Krause.* Physiological Reviews, 87, 1, 245-313, 2007.
11. *Karapetyan A.V., Simonyan G.M., Anne-Frances Miller, Bert Lynn Jr, Babayan M.A., Simonyan R.M., Simonyan M.A.* Cytochromes b_{558} III from erythrocyte membranes: some physico-chemical properties. 227th ACS National Meeting, Anaheim, CA, 2004.
12. *Karen Bedard, Karl-Heinz Krause.* Physiological Reviews, The Nox family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiological Reviews, 87, 1, 245-313, 2007.
13. *Simonyan G.M.* The denaturing effect of ultrasound on the erythrocyte membranes cytochrome b_{558} ex vivo and in vitro. Electronic J. of Natural Sciences of NAS RA, 1, 10, 10-12, 2008.
14. *Simonyan R.M., Simonyan G.M., Oxuzyan G.R., Alexanyan S.S., Simonyan M.A.* The hemoglobin induces releasing of the extracellular NADPH oxidase in mammalian blood serum and fluids of ascitic carcinomas in vitro and in vivo. Issues in theoretical and clinical medicine, 17, 2, 16-21, 2014.

Поступила 16.10.2017



Biol. Journal of Armenia, 1 (70), 2018

THE ROLE OF CALPAIN IN SPINAL CORD DEGENERATION IN EXPERIMENTAL PARKINSON'S DISEASE

V.H. KNARYAN

H. Buniatian Institute of Biochemistry NAS RA
vknaryan@yahoo.com

In this review the critical role of Ca^{2+} -dependent protease calpain in the cascade of intracellular processes, leading to degeneration and death of spinal cord neurons in experimental models of Parkinson's disease (PD) is discussed. In experimental conditions parkinsonian neurotoxins 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and rotenone cause the activation of calpain and caspase-3, which subsequently cleave cytoskeletal protein spectrin and axonal neurofilament light protein (NF-L). In the absence of the protease inhibitors, these processes can lead to structural and functional alterations in neurons and axons. It has been demonstrated that calpain inhibition provides neuroprotection in the spinal cord in experimental PD.

Parkinson's disease – spinal cord – neurodegeneration – calpain

Ավանդում քննարկվում է Ca^{2+} -կախյալ պրոտեազի՝ կալպաինի առանցքային դերը ներ-բջջային պրոցեսների կասկածում, որոնք կործանարար են ազդում ողնուղեղի նեյրոնների վրա փորձարարական Պարկինսոնի հիվանդության (ՊԲ) ժամանակ: Պարկինսոնիզմ առաջացնող նեյրո-տոքսինների՝ 1-մեթիլ-4-ֆենիլ-1,2,3,6-տետրահիդրո-պիրիդինի (ՄՖՏՊ) և ռոտենոնի ազդեցության արդյունքում ակտիվանում են կալպաինը և կասպազ-3-ը, որոնք քայքայում են բջջի կառուցված-քային սպիտակուցը՝ սպեկտրինը և աքսոնների նեյրոֆիլամենտի թեթև սպիտակուցը: Պրո-տեազների ինհիբիտորների բացակայության դեպքում այս պրոցեսները կարող են նեյրոնների և աքսոնների կառուցվածքային փոփոխությունների և ֆունկցիոնալ խանգարումների պատճառ դառնալ: Ցույց է տրվել, որ կալպաինի արգելակումը պաշտպանիչ դեր ունի ողնուղեղում:

Պարկինսոնի հիվանդություն – ողնուղեղ – նեյրոդեգեներացիա – կալպաին

В обзоре обсуждается ключевая роль Ca^{2+} -зависимой протеазы кальпаина в каскаде внутриклеточных процессов, ведущих к вырождению нейронов спинного мозга при болезни Паркинсона (БП). В экспериментальных условиях нейротоксины 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП) и ротенон, вызывающие паркинсонический синдром, запускают активацию кальпаина и каспазы-3, которые расщепляют структурный белок цитоскелета спектрин и аксональный белок нейрофиламента легкого (NF-L). В отсутствие ингибиторов протеаз эти процессы могут привести к нарушениям структурной целостности и функциональной активности нейронов и аксонов в спинном мозге. Показано, что ингибирование кальпаина оказывает нейропротекторное действие в спинном мозге.

Болезнь Паркинсона – спинной мозг – нейродегенерация – кальпаин

Parkinson's disease

Parkinson's disease (PD) is a complex movement disorder, characterized by resting tremor, muscle rigidity, bradykinesia and/or akinesia, postural instability. The disturbances in motor functions are predominantly ascribed to degeneration and death of

neuromelanin-containing dopaminergic neurons situated in the A9 region of substantia nigra pars compacta (SNpc), and reduction of dopaminergic neurotransmission in caudate nucleus of corpus striatum [14]. Intracellular inclusions, called Lewy bodies and Lewy neurites, comprised of abnormally aggregated filaments of α -synuclein fibrillar protein, serve as histopathological hallmarks of damaged dopaminergic neurons [13]. It is well documented that sporadic PD-associated Lewy bodies are distributed over the central, peripheral, and enteric nervous systems; this indicates widespread distribution of neurodegenerative processes, including multiple extranigral nuclei of the nervous system [17]. Consequently, topographic distribution of the Lewy pathology can help in explaining complex functional disturbances, differentiated as non-motor autonomic, vegetative, sensory, and psychiatric symptoms, which are developed before or accompany motor dysfunctions at PD.

Despite substantial evidence of nigrostriatal degeneration, spinal cord, which is the final coordinator of motor functions, has also been considered to be implicated in the progression of PD. It has been discussed earlier that neurodegenerative processes related to PD and α -synuclein inclusions occur in the spinal cord as well [1, 2, 17]. In our studies, neurodegenerative changes have been detected in the spinal cord of PD patients (*postmortem*), as well as in experimental *in vivo* and *in vitro* models of PD [2, 18, 28-32]. It has been shown that calpain plays critical role in the development of intracellular processes leading to neurodegeneration and death of spinal neurons and motoneurons.

Calpain and its role in neurodegeneration

Calpain is a Ca^{2+} -dependent cytosolic cysteine protease, which is widely expressed in the central nervous system (CNS) [12, 25]. Two ubiquitously distributed mammalian calpains have been identified: μ -calpain (calpain I, CAPN1) and m-calpain (calpain II, CAPN2), activated *in vitro* by low (2-80 μM) and high (0.2-0.8 mM) intracellular Ca^{2+} concentrations, respectively. Therefore, calpain is getting involved in signaling pathways regulated by increased concentrations of Ca^{2+} . The molecules of μ - and m-calpain are comprised of large catalytic (78-80 kDa) and regulatory (30 kDa) subunits, C-terminals of which contain calmodulin-like Ca^{2+} -binding domains. Glycin-containing N-terminal domain of the regulatory subunit plays role in calpain activation, facilitating binding of the proenzyme to the membranes. At relatively low intracellular Ca^{2+} concentrations (50-100 nM) calpain exists as a proenzyme, which is activated at increasing *in vivo* levels of free intracellular Ca^{2+} and dissociated from inactive into active subunits (78 kDa and 18 kDa) that have enhanced access to cytosolic and membrane-associated substrates.

The proteolytic activity of μ - и m-calpain in mammalian cells is regulated by its specific endogenous inhibitor, ubiquitously expressed protein, calpastatin [9]. Calpastatin prevents the calpain overactivation, providing physiologically normal environment in the cells. On the other hand, calpastatin is a substrate for calpain, therefore uncontrolled prolonged overactivation of the calpain leads to calpastatin proteolysis as well; thus, imbalance in calpain-calpastatin ratio enhances the level of intracellular proteolytic reactions. Neuroprotective role of calpastatin has been shown in calpastatin-expressing transgenic mice, which resist experimental brain injury, demonstrating significantly less behavioral alterations and lower level of proteolysis of calpain substrates [36]. However, having a large molecular size of 110 kDa, calpastatin is not permeable for cellular membranes, therefore is not considered as a potential therapeutic agent for inhibition of increasing calpain activity in CNS disorders, including PD.

Calpain usually modifies but does not fully degrade substrates. Under physiological conditions calpain causes limited proteolysis of proteins (break of specific peptide bonds depending on the amino acid sequence of a protein), modifying their

biological role and activities; the modified proteins are involved in the processes of cell migration and differentiation, rearrangement of the cytoskeleton [24]. There are many intracellular protein substrates for calpain, such as, receptors, kinases, phosphatases, synaptosomal and cytoskeletal proteins. Calpain-mediated cleavage of these substrates is essential for regulation of neurochemical processes, synthesis, release and uptake of neurotransmitters, and also for maintenance of integrity of neuronal cytoskeleton [15]. In some cases, proteolytic activity of calpain combined with other protein degradation machinery (proteosomes, lysosomes, etc.) leads to the breakdown of a complete peptide into amino acids, which is essential in detoxification of harmful proteins.

At pathological conditions, uncontrolled calpain activation along with other proteases causes breakdown of essential cellular proteins (e.g., spectrin), DNA fragmentation, leading to programmed cell death. Calpain is involved in activation and migration of inflammatory mediators, including astrocytes, microglia, T cells, and macrophages [4]. In neurodegenerative processes, associated with mitochondrial dysfunction and imbalance of intracellular Ca^{2+} levels, calpain activation triggers cascade of apoptotic reactions, leading to neuronal cell death [41]. Calpain activation is regulated by its intracellular protein substrates, particularly those, directly associated with cell degradation mechanisms. These are mitochondrial membrane proteins (Bax, Bcl-2), receptor inositol triphosphate protein (IP_3), calmodulin-binding G proteins and calcineurin), myelin basic protein (MBP) and myelin proteolipid protein (PLP), cytoskeletal proteins (α -spectrin, actin, microtubule-associated protein 2, neurofilamentous proteins, tau protein, α -synuclein), apoptosis-inducing factor (AIF), signal transduction enzymes (phospholipase C, protein kinase C, protein phosphatase IIb), transcription factors (c-Fos, c-Jun), calpastatin and numerous structural signaling and cytosolic proteins [41].

Calpain upregulation has been implicated in neurological disorders, such as cerebral ischemia and traumatic brain injury [3, 8, 36], spinal cord injury [34], demyelinating disorders, amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis [26, 35, 38], chronic neurodegenerative disorders, including Alzheimer's disease, PD and Huntington's disease [41], experimental optic neuritis [37], and several non-neuronal disorders (muscular dystrophy, cataracts, arthritis, and others) [44]. Increased calpain expression has been demonstrated for the midbrain of PD patients *postmortem* [23]. Importantly, α -synuclein, the component of Lewy bodies, is the essential substrate for calpain in the brain of PD patients [21]. Through a multiple step process, calpain mediates a cleavage of α -synuclein, generating high molecular protein chains, aggregates of which are accumulated in Lewy bodies. This calpain-mediated mechanism of Lewy body formation plays crucial role in PD neuropathology. Moreover, detection of calpain-cleaved fragments of α -synuclein in the brain neurons and their colocalization with active calpain suggested direct involvement of calpain I in α -synuclein aggregation process at α -synucleinopathies [10].

Overactivation of calpain and subsequent cleavage of its intracellular substrates in CNS has detrimental effects, which destroy structural and functional integrity of neurons, axons, and myelin. Particularly, calpain I cleaves cytoskeletal protein α -II-spectrin, which plays important role in maintenance of plasma membrane integrity and cytoskeletal structure, producing spectrin breakdown products (SBDP); the latest are considered as biomarkers of the degenerating neurons damaged through proteolysis [20, 43].

Calpain-mediated mechanism for structural protein degradation of neurons and axons has been implicated in experimental cerebral ischemia and traumatic brain injury [3, 27], spinal cord injury [34], and demyelinating diseases [35]. In experimental optic neuritis early calpain activation and calpain-mediated cleavage of main downstream

target collapsing response mediator protein-2 (CRMP2) resulted in acute axonal degeneration of the optic nerve; however, calpain inhibition and/or CRMP2 overexpression rescued impairment of axonal mitochondrial transport, preventing fragmentation of proximal axons [45].

Calpain is involved in apoptotic pathway of cell death in association with initiator and effector caspases; cross activation of proteases at early stages of apoptosis may occur. According to this scenario, active calpain cleaves pro-caspase-3 with formation of active caspase-3, which in turn breaks calpain inhibitor, calpastatin. Imbalance of the intracellular calpain and calpastatin ratio results in uncontrolled calpain overactivation [42]. Since caspase-3 is also involved in regulation of calpain activity, we have simultaneously studied the active subunits of these two proteases in our work.

Calpain and its role pathogenesis of PD

There is a growing amount of evidence that PD pathology is associated with consistent systemic mitochondrial dysfunction and aberrant Ca^{2+} homeostasis, which lead to activation of cell signaling cascades and generation of the environment that is highly conducive to upregulate Ca^{2+} -dependent proteases, i.e. calpain and caspase-3 [16, 33]. The impairment of mitochondrial function and unregulated elevation of intracellular Ca^{2+} can be induced by mitochondrial toxins, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and rotenone. *In vivo* MPTP is converted to active metabolite 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP^+); rotenone is a naturally occurring substance, known as a pesticide. These compounds are accepted parkinsonian neurotoxins, which affect mitochondrial function of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc), and therefore are widely used to generate experimental *in vivo* and *in vitro* PD models, where mitochondria play key role in cell death mechanisms.

The mechanisms of MPTP/ MPP^+ and rotenone toxicity in CNS have been thoroughly investigated. Both, MPP^+ and rotenone are accumulated in dopaminergic neurons and bind to NADH dehydrogenase and coenzyme Q, inhibiting NADH:quinone reductase (complex I) activity in the mitochondrial respiratory chain. Subsequent chain reactions - inhibition of oxidative phosphorylation, loss of mitochondrial membrane potential, release of mitochondrial cytochrome c, ROS generation, resulting in sustainable mitochondrial dysfunction and oxidative stress, are characteristic for nigrostriatal degeneration at idiopathic PD as well in experimental PD models [22, 39]. The critical event is elevation and accumulation of intracellular free Ca^{2+} , inducing activation of proteases [16, 19]. It has been demonstrated that MPTP-induced caspase-3 activation mediates apoptosis of dopaminergic neurons in SNpc in mice [40]. Perhaps, activated caspase-3 can sustain calpain activation in PD [11]. However, timing for active protease induction is different, depending on certain experimental conditions. For example, rotenone-induced early activation of calpain in primary cortical neurons *in vitro* precedes caspase-3 activation, culminating in neuronal apoptosis [5]. Thus, cross-communication between calpain and caspases has been suggested as a possible mechanism of apoptotic neuronal cell death [30].

The role of calpain and caspase-3 in the spinal cord degeneration in experimental models of PD was studied. The results of the study are briefly presented in this review. The expression of proteases and their active subunits were determined by Western blotting (immunoblotting) of spinal cord samples, using antibodies against inactive and active calpain (80 kDa and 76 kDa, respectively), and caspase-3 (proenzyme 32 kDa and active subunits). Neuronal localization was assessed by *in situ* double immunofluorescent staining of spinal cord slices with antibodies against calpain or caspase-3 in combination with NeuN (neuronal nuclei immunomarker). Neuronal cell damage and DNA fragmentation was evaluated with TUNEL (terminal deoxynucleotidyl

transferase (TdT) recombinant-mediated dUTP nick-end labeling) immunofluorescent assay.

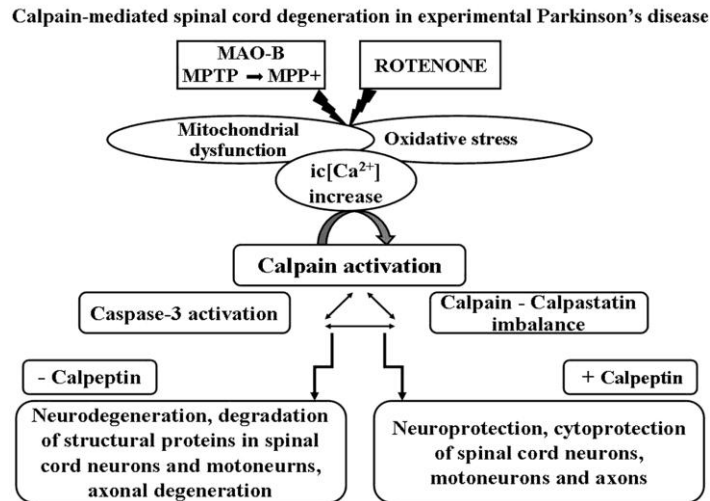


Fig.1. Schematic presentation of the calpain-mediated pathway of spinal cord degeneration at PD. Exposure to parkinsonian toxins MPTP/MPP⁺ and rotenone (*in vivo*, *in vitro*) causes mitochondrial dysfunction, oxidative stress and consequent increase in intracellular Ca²⁺ level, leading to calpain and caspase-3 activation. In absence of calpeptin (-), a calpain inhibitor, activation of proteases converges to cleavage of intracellular substrates, culminating in neurodegeneration and axonal degeneration. Inhibition of calpain by calpeptin (+) provides neuroprotection in the spinal cord.

Rotenone-induced calpain activation in the spinal cord

We have explored the rotenone-induced *in vivo* model of PD and studied the activation of calpain and caspase-3 as possible intrinsic mechanism, mediating cell death and neurodegeneration in spinal cord [29]. Rotenone was injected to adult male Lewis rats (total 25 mg/kg over 21 days, s.c.). Sections from upper (cervical) and lower (lumbar) segments of spinal cord from rotenone-injected and vehicle-treated Lewis rats were isolated, sliced (5 μ M), and then used for *in situ* double immunofluorescent staining of TUNEL combined with NeuN (neuronal nuclei immunomarker) or ChAT (choline acetyltransferase, cholinergic motoneuron immunomarker). Microscopic observation of immunofluorescent samples revealed TUNEL-positive damaged neurons and motoneurons in cervical and lumbar spinal cord slices of rotenone-injected rats compared to controls. Damaged neurons (NeuN) and motoneurons (ChAT) were identified in dorsal and ventral horn areas of the spinal cord, respectively. Western blotting of protein samples showed significant ($p \leq 0.05$; $n \geq 4$) elevation of the active calpain (76 kDa) levels in cervical (by 86%) and lumbar (90%) spinal cord tissues from rotenone-treated rats compared to controls. Meanwhile, the level of inactive calpain (80 kDa) in the spinal cord had not changed either in control, or rotenone-injected rats. These findings have been additionally confirmed by double immunofluorescent staining of cervical and lumbar spinal cord slices by antibodies against proteases. Colocalization of positive immunoreactivity for active calpain and caspase-3 along with NeuN-immunoreactive neurons in rotenone-treated rats, but not in controls, demonstrated neuronal localization of the active proteases. Besides, presence of two active proteases in neurons disclosed their parallel participation in proteolytic pathways leading to neuronal damage.

Rotenone-induced activation of calpain and caspase-3 in spinal cord caused proteolysis of α -II-spectrin (270 kDa) into calpain-specific 145 kDa SBDP and caspase-3-specific 120 kDa SBDP, which were assessed by Western blotting. The levels of calpain- and caspase-3-specific SBDP significantly ($p \leq 0.05$; $n \geq 4$) increased in cervical spinal cord by 55% and 60%, and in lumbar spinal cord – by 35% and 30%, respectively. These results substantiated the calpain- and caspase-3-mediated damage of the cytoskeleton and degeneration of the neurons in response to rotenone neurotoxicity in the spinal cord [29].

MPTP neurotoxicity in spinal cord and neuroprotection via calpain inhibition

The calpain-mediated pathway of spinal cord neurodegeneration has been studied in MPTP-induced *in vivo* model of PD [2, 28, 32]. MPTP was injected to linear C57BL/6N mice (2 x 25 mg/kg, i.p., 6 h interval). Degenerated neurons in the spinal cord were assessed through double TUNEL and NeuN immunofluorescent assay, mentioned above. The results of microscopic observation of slices showed that MPTP induced neurodegenerative processes in both, midbrain SNpc and spinal cord. Numerous positive TUNEL-NeuN neurons in the spinal cord slices of MPTP-injected mice, but not in controls, indicated degenerating neurons in the spinal cord. Obtained proof of the *in vivo* metabolic conversion of MPTP to the active MPP^+ ion in the spinal cord additionally demonstrated the direct impact of MPTP/ MPP^+ on the development of neurodegenerative processes in the spinal cord [28]. It has been suggested that mitochondrial dysfunction, oxidative stress and imbalance of intracellular Ca^{2+} lead to calpain upregulation with concomitant activation of signaling pathways, leading to neuroapoptosis. The earlier reports from the same laboratory had shown MPTP-induced increase in expression of calpain in the neurons, as well as in microglia and astrocytes, suggesting calpain-mediated activation of inflammatory reactions [6].

The critical role of activated calpain in PD pathogenesis impelled investigations toward discovery of calpain inhibitors, which could be considered as potential therapeutic agents to slowdown and/or to prevent neurodegenerative processes [24]. For example, inhibition of calpain by MDL-28170 or increased calpastatin expression had protective effects on dopaminergic neurons in the midbrain and prevented behavioral deficits in an MPTP mouse model of PD [7].

To elucidate the calpain-mediated neurodegeneration of spinal cord in MPTP-induced mouse model of PD, we studied the neuroprotective efficiency of a calpain inhibitor, calpeptin [32]. Calpeptin is a synthetic cell-permeable peptide aldehyde, cytoprotective effects of which have been explored *in vivo* and *in vivo*. We found significant decrease of TUNEL-NeuN colocalization sites in the spinal cord of MPTP-injected mice pretreated with calpeptin (25 μ g/kg), then in merely MPTP-injected mice; these data signified that neuroprotection in the spinal cord occurred via calpain inhibition by calpeptin, and additionally confirmed calpain involvement in spinal cord neurodegeneration induced by MPTP. Immunofluorescent assay with antibody detecting dephosphorylated neurofilament protein (deNFP) showed increased level of deNFP immunoreactivity, indicating that effects of MPTP are not limited, but extended beyond neuronal bodies, targeting and damaging axons in the mice spinal cord. Nevertheless, pretreatment of mice with calpeptin significantly reduced deNFP immunoreactivity about to the control level. Neuroprotective efficiency, provided by calpeptin via calpain inhibition, extended all through ventral and dorsal areas of the cervical and lumbar spinal cord regions. In these studies we also demonstrated that inhibition of calpain mitigates MPTP-induced alterations in symptomatic for PD gait parameters - stride length and stride frequency, measured with DigiGait videography. Thus, calpain inhibition by calpeptin protected spinal neurons and axons against MPTP-induced neurotoxicity *in vivo*, whereas in absence of calpeptin neurodegenerative processes steadily developed,

resulting in neuronal and axonal damage, and significant impairment in gait dynamics [32]. Importantly, in PD *postmortem* studies immunofluorescent staining showed that immunoreactivity of axonal 62 kDa neurofilament light protein (NF-L) in the cervical spinal cord was significantly lower (by 29%; $p \leq 0.05$) than in normal cases [31]. Axonal degeneration was further confirmed by increased deNFP immunoreactivity in the spinal cord of PD patients than in normal cases (by 53% and 55%, $p \leq 0.05$, higher in cervical and thoracic sections, respectively). These findings indicated the involvement of calpain in axonal degeneration at PD. These data suggest calpain as a therapeutic target to prevent processes of neurodegeneration and axonal degeneration in the spinal cord at PD.

MPP⁺ and rotenone toxicity in motoneurons and cytoprotection by calpeptin

We have studied *in vitro* the mechanisms of MPP⁺- and rotenone-induced calpain activation using hybrid ventral spinal cells (VSC 4.1) differentiated into spinal motoneurons and possible cytoprotection via calpain inhibition [30]. Incubation of motoneurons in the presence of MPP⁺ (25 and 100 μ M) and rotenone (10 and 50 nM) dramatically reduced viability of these cells. A cascade of intracellular events had been triggered by neurotoxin exposure, including DNA fragmentation, rise in TUNEL immunofluorescence, and increase in the ratio of mitochondrial membrane pro- and anti-apoptotic Bax:Bcl-2 proteins, respectively. Such intracellular processes are characteristic of intrinsic mitochondrial signaling pathway activation, culminating in apoptotic cell death. The critical step in this machinery is increasing Ca²⁺ level, which drives activation of proteases.

Calpain and caspase-3 were diversely upregulated by MPP⁺ and rotenone depending on the neurotoxin dose and time of exposure, with concomitant formation of active subunits of calpain (76 kDa) and caspase-3 (12 and 20 kDa). Induction of active proteases promoted proteolytic cleavage of spectrin with formation of calpain-specific (145 kDa) and caspase-3 specific (120 kDa) SBDP, respectively. However, preincubation of motoneurons with calpeptin before exposure to neurotoxins markedly suppressed neurotoxic effects of MPP⁺ and rotenone. The positive outcomes of calpain inhibition included increased cell viability, decreased levels of active proteases and hence, reduced SBDP formation; the latter is essential to preserve structural and functional integrity of motoneurons. Thus, neuroprotective efficacy of calpain inhibition by calpeptin *in vitro* confirmed the role of calpain in degeneration of spinal motoneurons [30].

Taking together, the results of our studies suggest calpain inhibition as a prospective tool to preserve structural and functional integrity of spinal neurons and motoneurons, and to prevent and/or slow down development of neurodegenerative processes in the spinal cord at PD.

Acknowledgements

This review is based on our studies conducted in the Medical University of South Carolina (Charleston, USA) supported in part by grants from the NINDS/NIH (Bethesda, USA), in collaboration with Dr. Supriti Samantaray and under the supervision of Dr. Naren L. Banik.

REFERENCES

1. Княрян В.А. Экстранигральная патология и нейродегенерация спинного мозга при болезни Паркинсона. Мед. наука Армении, LVI, 4, с. 3-12, 2016.
2. Княрян В.А. Нейродегенерация спинного мозга при экспериментальной болезни Паркинсона индуцированной 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином. Мед. наука Армении, LVII, 2, с. 25-32, 2017.

3. Bevers M.B., Neumar R.W. Mechanistic role of calpains in postischemic neurodegeneration. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 28, 4, 655-673, 2008.
4. Butler J.T., Samantaray S., Beeson C.C., Ray S.K., Banik N.L. Involvement of calpain in the process of Jurkat T cell chemotaxis. *J. Neurosci. Res.*, 87, 3, p. 626-635, 2009.
5. Chen M.J., Yap Y.W., Choy M.S., Koh C.H., Seet S.J., Duan W., Whiteman M., Cheung N.S. Early induction of calpains in rotenone-mediated neuronal apoptosis. *Neurosci. Lett.*, 397, 1-2, p. 69-73, 2006.
6. Chera B., Schaecher K.E., Rocchini A., Imam S.Z., Sribnick E.A., Ray S.K., Ali S.F., Banik N.L. Immunofluorescent labeling of increased calpain expression and neuronal death in the spinal cord of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice. *Brain Res.*, 1006, 2, p. 150-156, 2004.
7. Crocker S.J., Smith P.D., Jackson-Lewis V., Lamba W.R., Hayley S.P., Grimm E., Callaghan S.M., Slack R.S., Melloni E., Przedborski S., Robertson G.S., Anisman H., Merali Z., Park D.S. Inhibition of calpains prevents neuronal and behavioral deficits in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.*, 23, 10, p. 4081-4091, 2003.
8. Curcio M., Salazar I.L., Mele M., Canzoniero L.M., Duarte C.B. Calpains and neuronal damage in the ischemic brain: The swiss knife in synaptic injury. *Prog. Neurobiol.*, 143, p. 1-35, 2016.
9. De Tullio R., Averna M., Pedrazzi M., Sparatore B., Salamino F., Pontremoli S., Melloni E. Differential regulation of the calpain-calpastatin complex by the L-domain of calpastatin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1843, 11, p. 2583-2591, 2014.
10. Dufty B.M., Warner L.R., Hou S.T., Jiang S.X., Gomez-Isla T., Leenhouts K.M., Oxford J.T., Feany M.B., Masliah E., Rohn T.T. Calpain-cleavage of alpha-synuclein: connecting proteolytic processing to disease-linked aggregation. *Am. J. Pathol.*, 170, 5, p. 1725-1738, 2007.
11. Esteves A.R., Arduino D.M., Swerdlow R.H., Oliveira C.R., Cardoso S.M. Dysfunctional mitochondria uphold calpain activation: contribution to Parkinson's disease pathology. *Neurobiol. Dis.*, 37(3), p. 723-730, 2010.
12. Guroff G. A neutral calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J. Biol. Chem.*, 239, p. 149-155, 1964.
13. Goedert M., Spillantini M.G., Del Tredici K., Braak H. 100 years of Lewy pathology. *Nature reviews/ Neurology*, 9, 1, p. 13-24, 2013.
14. Hornykiewicz O. Basic research on dopamine in Parkinson's disease and the discovery of the nigrostriatal dopamine pathway: the view of an eyewitness. *Neurodegener. Dis.*, 5, 3-4, p. 114-117, 2008.
15. Karpenko M.N., Tikhomirova M.S. The role of calpains in the regulation of synaptic function. *Russ. Fiziol. Zh. Im. I.M. Sechenova*, 100, 4, p. 385-393, 2014.
16. Keane P.C., Kurzawa M., Blain P.G., Morris C.M. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis.*, 2011, p. 716871, 2011.
17. Knaryan V.H., Samantaray S., Le Gal C., Ray S.K., Banik N.L. Tracking extranigral degeneration in animal models of Parkinsonism: Quest for effective therapeutic strategies. *J. Neurochem.*, 118, 3, p. 326-338, 2011.
18. Knaryan V.H., Samantaray S., Park S., Azuma M., Inoue J., Banik N.L. SNJ-1945, a calpain inhibitor, protects SH-SY5Y cells against MPP⁺ and rotenone. *J. Neurochem.*, 130, 2, p. 280-290, 2014.
19. Krieger C., Duchon M.R. Mitochondria, Ca²⁺ and neurodegenerative disease. *Eur. J. Pharmacol.*, 447, 2-3, p. 177-188, 2002.
20. Lewis S.B., Velat G.J., Miralia L., Papa L., Aikman J.M., Wolper R.A., Firment C.S., Liu M.C., Pineda J.A., Wang K.K., Hayes R.L. Alpha-II spectrin breakdown products in aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a novel biomarker of proteolytic injury. *J. Neurosurg.*, 107, 4, p. 792-796, 2007.
21. Mishizen-Eberz A.J., Norris E.H., Giasson B.I., Hodara R., Ischiropoulos H., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Lynch D.R. Cleavage of alpha-synuclein by calpain: potential role in degradation of fibrillized and nitrated species of alpha-synuclein. *Biochemistry*, 44, 21, p. 7818-7829, 2005.

22. Mizuno Y., Hattori N., Kubo S., Sato S., Nishioka K., Hatano T., Tomiyama H., Funayama M., Machida Y., Mochizuki H. Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 363, 1500, p. 2215-2227, 2008.
23. Mouatt-Prigent A., Karlsson J.O., Agid Y., Hirsch E.C. Increased m-calpain expression in the mesencephalon of patients with Parkinson's disease but not in other neurodegenerative disorders involving the mesencephalon: a role in nerve cell death? *Neuroscience*, 73,4, p. 979-987, 1996.
24. Ono Y., Saïdo T.C., Sorimachi H. Calpain research for drug discovery: challenges and potential. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 15, 12, 854-876, 2016.
25. Ono Y., Sorimachi H. Calpains: an elaborate proteolytic system. *Biochem. Biophys. Acta*, 1824, p. 224-236, 2012.
26. Rao M.V., Campbell J., Palaniappan A., Kumar A., Nixon R.A. Calpastatin inhibits motor neuron death and increases survival of hSOD1(G93A) mice. *J. Neurochem.*, 137, 2, 253-265, 2016.
27. Saatman K.E., Creed J., Raghupathi R. Calpain as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*, 7, 1, p. 31-42, 2010.
28. Samantaray S., Knaryan V.H., Butler J.T., Ray S.K., Banik N.L. Spinal cord degeneration in C57BL/6N mice following induction of experimental parkinsonism with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J. Neurochem.*, 104, 5, p. 1309-1320, 2008.
29. Samantaray S., Knaryan V.H., Guyton M.K., Matzelle D.D., Ray S.K., Banik N.L. The parkinsonian neurotoxin rotenone activates calpain and caspase-3 leading to motoneuron degeneration in spinal cord of Lewis rats. *Neuroscience*, 146, 2, p. 741-755, 2007.
30. Samantaray S., Knaryan V.H., Le Gal C., Ray S.K., Banik N.L. Calpain inhibition protected spinal cord motoneurons against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion and rotenone. *Neuroscience*, 192, p. 263-274, 2011.
31. Samantaray S., Knaryan V.H., Shields D.C., Banik N.L. Critical role of calpain in spinal cord degeneration in Parkinson's disease. *J. Neurochem.*, 127, 6, p. 880-890, 2013.
32. Samantaray S., Knaryan V.H., Shields D.C., Cox A.A., Haque A., Banik N.L. Inhibition of calpain activation protects MPTP-induced nigral and spinal cord neurodegeneration, reduces inflammation, and improves gait dynamics in mice. *Mol. Neurobiol.*, 52, 2, p. 1054-1066, 2015.
33. Samantaray S., Ray S.K., Banik N.L. Calpain as a potential therapeutic target in Parkinson's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, 7, 3, p. 305-312, 2008.
34. Samantaray S., Sribnick E.A., Das A., Knaryan V.H., Matzelle D.D., Yallapragada A.V., Reiter R.J., Ray S.K., Banik N.L. Melatonin attenuates calpain upregulation, axonal damage and neuronal death in spinal cord injury in rats. *J. Pineal Res.*, 44, 4, p. 348-357, 2008.
35. Schaefer K.E., Shields D.C., Banik N.L. Mechanism of myelin breakdown in experimental demyelination: a putative role for calpain. *Neurochem. Res.*, 26, 6, p. 731-737, 2001.
36. Schoch K.M., Evans H.N., Brelsfoard J.M., Madathil S.K., Takano J., Saïdo T.C., Saatman K.E. Calpastatin overexpression limits calpain-mediated proteolysis and behavioral deficits following traumatic brain injury. *Exp. Neurol.*, 236, 2, p. 371-382, 2012.
37. Smith A.W., Rohrer B., Wheless L., Samantaray S., Ray S.K., Inoue J., Azuma M., Banik N.L. Calpain inhibition reduces structural and functional impairment of retinal ganglion cells in experimental optic neuritis. *J. Neurochem.*, 139(2), p. 270-284, 2016.
38. Stifanese R., Averna M., De Tullio R., Pedrazzi M., Milanese M., Bonifacino T., Bonanno G., Salamino F., Pontremoli S., Melloni E. Role of calpain-1 in the early phase of experimental ALS. *Arch. Biochem. Biophys.*, 562, p. 1-8, 2014.
39. Subramaniam S.R., Chesselet M.F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.*, 106-107, p. 17-32, 2013.
40. Turmel H., Hartmann A., Parain K., Douhou A., Srinivasan A., Agid Y., Hirsch E.C. Caspase-3 activation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mice. *Mov. Disord.*, 16(2), 185-189, 2001.
41. Vosler P.S., Brennan C.S., Chen J. Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.*, 38(1), p. 78-100, 2008.
42. Wang K.K., Posmantur R., Nadimpalli R., Nath R., Mohan P., Nixon R.A., Talanian R.V., Keegan M., Herzog L., Allen H. Calpain-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 356(2), p. 187-196, 1998.

43. Yan X.X., Jeromin A., Jeromin A. Spectrin breakdown products (SBDPs) as potential biomarkers for neurodegenerative diseases. *Curr. Transl. Geriatr. Exp. Gerontol. Rep.*, 1(2), p. 85-93, 2012.
44. Yuen P.-W., Wang K.K.W. Therapeutic potential of calpain inhibitors in neurodegenerative disorders. *Exp. Opin. Invest. Drugs*, 5 (10), p. 1291–1304, 1996.
45. Zhang J.N., Koch J.C. Collapsin response mediator protein-2 plays a major protective role in acute axonal degeneration. *Neural. Regen. Res.*, 12(5), p. 692-695, 2017.

Received on 09.01.2018



Биолог. журн. Армении, 1 (70), 2018

ИЗМЕНЕНИЕ ИНТЕГРАТИВНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОРГАНИЗМА ПРИ КИСЛОРОДНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ НЕМБУТАЛА И УРЕТАНА

Н.Ю. АДАМЯН¹, М.А. КАРАПЕТЯН¹, Р.Ш. САРКИСЯН²,
Т.А. АЙРАПЕТЯН¹

¹- Ереванский госуниверситет, кафедра физиологии человека и животных,

²-Институт физиологии им. Л.А.Орбели НА РА,
nona01011966@mail.ru

Исследовалось изменение общего физиологического состояния организма под влиянием наркотических веществ (нембутал и уретан) в условиях острой кислородной недостаточности. Для оценки целостного состояния организма использован аппаратный комплекс “Биоскоп”. Показано, что комбинированное воздействие гипоксии и наркоза достоверно угнетает значения интегративных показателей организма. После снятия гипоксического фактора у интактных животных (только гипоксия) параметры сигнала становятся выше нормы, а у наркотизированных – ниже.

Гипоксия – интегративный сигнал – уретан – нембутал

Ուսումնասիրվել է օրգանիզմի ընդհանուր ֆիզիոլոգիական վիճակի փոփոխությունը թմրեցնող նյութերի (նեմբուտալ և ուրետան) ազդեցությամբ թթվածնային անբավարարության պայմաններում: Որպես ընդհանուր վիճակի ցուցանիշ ուսումնասիրվել է ինտեգրատիվ ազդանշանը, որը ձևավորվում է օրգանիզմի կազմավորման տարբեր մակարդակների ֆունկցիոնալ համակարգերի փոխազդեցության արդյունքում: Հիպոքսիայի և թմրանյութերի համակցված ազդեցությունը հավաստիորեն ճնշում է ինտեգրատիվ ազդանշանի ուսումնասիրվող ցուցանիշները: Հիպոքսիկ գործոնի վերացումից հետո ինտակտ կենդանիների (միայն հիպոքսիա) ցուցանիշները նորմայից բարձր են լինում, իսկ թմրեցվածներին՝ ցածր:

Հիպոքսիա – ինտեգրատիվ ազդանշան – նեմբուտալ – ուրետան

We studied the influence of acute hypoxia and anesthetics (nembutal and uretan) on the organism's integrative signal registered on the surface of rats body with the use of apparatus complex “Bioscope”. The experiment results suggest that the integrative signal is sensitive in the case of oxygen deficiency conditions and an drugs. It is shown the combined use of hypoxia and narcotics redouble the inhibition effect of both factors.

Hypoxia – integrative factor – Nembutal – uretan

Ранее нами было исследовано влияние острой кислородной недостаточности на функциональные системы клеточного (электрическая активность нейронов некоторых структур мозга) и системного (электроэнцефалограмма, дыхание, сердечная деятельность) уровней организма [2-4]. Все эти эксперименты проводились в условиях острого опыта с применением наркотических веществ.

В настоящее время разработан аппаратный комплекс “Биоскоп”, позволяющий проводить неинвазивную оценку целостного состояния организма [7, 8]. С использованием указанной аппаратуры нами было исследовано влияние кислородного дефицита на интегративное состояние бодрствующих животных [4].

Очевидно, что для получения более полной картины адаптационной деятельности функциональных систем различного уровня организации и функционального состояния организма в целом представляется необходимым изучение характера изменения физиологического состояния целостного организма животных, подвергнутых воздействию наркотических веществ в условиях кислородной недостаточности.

Главной целью настоящей работы являлось изучение влияния нембутала и уретана на интегративные показатели состояния животных при кислородной недостаточности, а также проведение сравнительного анализа их влияния на целостное состояние организма.

Материал и методика. С использованием аппаратного комплекса “Биоскоп” проведены эксперименты на 12 бодрствующих белых крысах массой 180-200 г. Чтобы обеспечить неизменность расстояния от животного до датчика биоскопа (15-20 мм), крысы помещались в специально сконструированную камеру, ограничивающую возможность их перемещения (рис. 1). Камеру с животным по условиям эксперимента помещали в лабораторную барокамеру.

В начале каждого эксперимента проводилась 20-минутная контрольная регистрация функционального состояния животных ($pO_2=142$ мм рт.ст.). После этого животные “поднимались” на высоту 7500-8000 м ($pO_2=64-58$ мм рт.ст.) и в течение 20-ти мин проводилась регистрация их состояния в условиях гипоксического воздействия. Для оценки постстрессорного состояния крыс сразу после “спуска” также проводилась 20-минутная регистрация их состояния в условиях нормального атмосферного давления. Кислородная недостаточность в барокамере создавалась путем откачивания воздуха. “Подъем” и “спуск” животного в барокамере производили со скоростью 15-20 м/с.

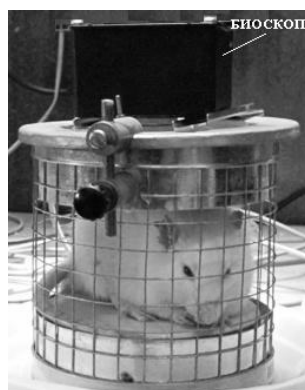


Рис. 1. Дистанционная регистрация физиологического состояния бодрствующей крысы.

Нембутал вводили из расчета 30 мг/кг, уретан – 1 г/кг. Сон наступает через 4-5 мин после введения [6]. Для анализа полученных данных использовалась комплексная программа, разработанная в среде LabView. Определялись последовательные межпиковые временные интервалы сигналов (ВВ-интервалы). Методом быстрого преобразования Фурье строились спектральные распределения для исходных сигналов “Биоскопа” и рассчитывались их полная мощность (FFT) и средняя частота осцилляций (F).

Для анализа взяты 20-минутные отрезки записи. Достоверность различия рассчитанных показателей до подъема, на высоте и после спуска оценивалась с использованием критерия Стьюдента при уровне значимости $p<0,05$.

Результаты и обсуждение. Известно, что в результате взаимодействия информационных сигналов, возникающих в функциональных системах разных уровней организаций, образуются определенные сигналы, несущие информацию об интегративном состоянии организма [7,8]. Эти сигналы очень чувствительны к различным экстремальным воздействиям [1]. Выяснилось, что некоторые параметры данного интегративного сигнала в условиях острой кислородной недостаточности несут определенные изменения [4].

У бодрствующих крыс в норме (до “подъема”) средняя частота осцилляций в 2 раза выше, чем у животных под наркозом (табл. 1, рис. 2). При острой гипоксии – на “высоте” 7,5-8 тыс. м у этих животных данный показатель повышается и после “спуска” (в условиях нормального атмосферного давления) существенно не меняется.

Таблица 1. Средняя частота осцилляции сигналов биоскопа (F) и мощность их спектрального распределения (FFT) у бодрствующих животных, а также при нембуталовом и уретановом наркозе.

БОДРСТВУЮЩИЕ	До “подъема”	Высота 7,5-8 тыс. м	После “спуска”
F (1/мин)	4.1±0.5	4.8±0.4	4.7±0.6
FFT	0.037±0.002	0.019±0.004	0.054±0.002
НЕМБУТАЛ			
F (1/мин)	2.2±0.3	1.1±0.2	1.9±0.4
FFT	0.057±0.004	0.011±0.002	0.045±0.003
УРЕТАН			
F (1/мин)	2.1±0.3	0.9±0.2	1.2±0.3
FFT	0.065±0.003	0.024±0.002	0.035±0.003

Другой показатель – мощность спектральной плотности сигналов “Биоскопа” бодрствующих крыс на “высоте” почти в 2 раза меньше, чем до “подъема”, а после “спуска” становится больше, чем в норме.

У крыс под наркозом (и при нембутале, и при уретане) в нормальных условиях частота осцилляций почти в 2 раза ниже, чем у бодрствующих. На “высоте” средняя частота осцилляций и при нембуталовом, и при уретановом наркозе падает примерно в 2 раза. После “спуска” у животных под нембуталовым наркозом наблюдается тенденция к восстановлению нормативных значений быстрее, чем у животных под уретановым наркозом. Под наркозом мощность спектра на высоте 7,5-8 тыс. м резко падает – при нембутале примерно в 5 раз, а при уретане почти в 3 раза. После “спуска” восстановление мощности спектра происходит медленнее, чем у бодрствующих крыс: через 20 мин после “спуска” этот показатель при нембутале остается в 1,3 раза ниже, чем до “подъема”, и в 1,8 раза ниже чем при уретане.

Известно, что в условиях острой кислородной недостаточности угнетается частота сердечных сокращений и дыхания, падает электрическая активность нейронов и суммарная активность клеток мозга [2, 3]. Однако некоторые показатели интегративного сигнала в этих условиях или активируются (частота осцилляции), или угнетаются (мощность спектра сигналов). А комбинированное воздействие гипоксии и наркоза достоверно угнетает эти показатели. Следует отметить, что после снятия гипоксического фактора у интактных животных (только гипоксия) параметры сигнала становятся выше нормы. Наши предыдущие опыты показали, что изменения показателей данного сигнала обладают определенной инерционностью. В данном случае у наркотизированных животных даже через 20 мин после гипоксии эти показатели остаются ниже, чем до “подъема”. Сравнение данных при нембуталовом и уретановом наркозе показывает, что вектор изменений под воздействием гипоксического стрессогенного фактора не меняется, но влияние уретана более выражено.

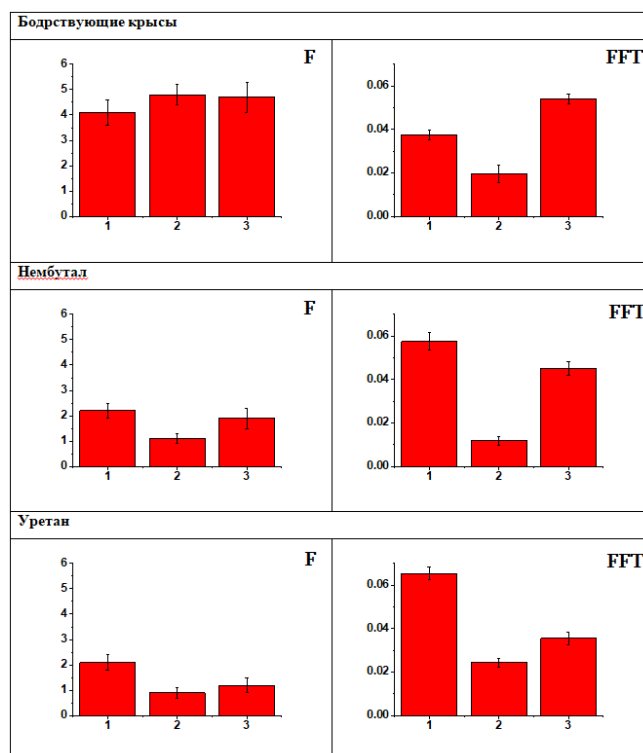


Рис.2. Изменение средней частоты осцилляции сигналов биоскопа (F) и мощности их спектрального распределения (FFT) у бодрствующих животных при нембуталовом и уретановом наркозе: 1-до “подъема”, 2-на высоте 7,5-8 тыс. м, 3-после “спуска”.

В научной литературе универсального ответа на вопрос о механизме действия веществ, вызывающих наркоз, нет. Исследователи считают, что общие анестетики могут быть разделены на две группы: вещества, взаимодействующие с мембранами нейронов за счет своих физических свойств, и вещества, оказывающие избирательное химическое действие на определенные клеточные рецепторы, участвующие в формировании ощущения боли. Неясностей остается достаточно. Так и не решен вопрос о том, каким образом столь разнообразные вещества и воздействия способны вызывать практически неразличимую картину наркоза [5].

Таким образом, у наркотизированных животных кислородная недостаточность приводит к достоверному снижению показателей интегративного сигнала организма, бесконтактно регистрируемого с поверхности тела. Сравнение данных, полученных при нембутале и уретане, показало, что в обоих случаях острая гипоксия угнетает частоту и мощность спектра сигналов “Биоскопа”, а после снятия стрессогенного фактора возвращение к норме происходит медленнее, чем у бодрствующих животных. Следует отметить, что наблюдаемые изменения при уретане более выражены.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авшалумов А.Ш., Судаков К.В., Филаретов Г.Ф. Новая информационная технология системной диагностики функциональной активности органов человека. Медицинская техника. 3, с.13-18, 2006.

2. *Акопян Н.С.* Электрофизиологические исследования деятельности мозга при гипоксии. Ереван, изд-во "Айастан", 1987.
3. *Акопян Н.С., Карапетян М.А. Саркисян Н.В.* Влияние лимбических структур на дыхание в условиях гипоксии. Успехи физиол. наук, М., 35, 4, с.41-48, 2004.
4. *Карапетян М.А., Адамян Н.Ю., Бадалян И.А.* Влияние острой кислородной недостаточности на интегративный сигнал организма. Новости медико-биологических наук, 14, 3, с.1-10, 2016.
5. *Прозоровский В.Б.* Механизмы наркоза. Наука и жизнь, 1, с.19-22, 2003 .
6. Руководство по анестезии. Под. ред. Бунятян А.А. М., Медицина, 656 с., 1994.
7. *Саркисян Р.Ш.* Новые аспекты функционирования биологических систем. Дисс. на соискание доктора биологических наук. Ереван. 2008.
8. *Draayer J.P., Grigoryan H.R., Sargsyan R. Sh., Ter- Grigoryan S.A.* Systems and Methods For Investigation of Living Systems. United States Patent Application Publication, US 2007/0149866 A1, Pub. Date: Jun. 28, 2007.

Поступила 06.11.2017



Биолог. журн. Армении, 1 (70), 2018

ВЛИЯНИЕ НЕТЕПЛООВОГО МИЛЛИМЕТРОВОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ ДНК ОПУХОЛИ САРКОМЫ 45

А.А. ТАДЕВОСЯН¹, Л.Н. ПЕТРОСЯН²,
М.А. ШАГИНЯН³, Г.Л. КАНАРЯН⁴

¹Ереванский государственный медицинский университет имени М.Гераци,

²Государственный инженерный университет,

³Ереванский госуниверситет,

⁴Ванадзорский государственный университет имени Ов.Туманяна
anitadevosyan85@gmail.com

Исследовалось влияние нетеплового миллиметрового электромагнитного излучения на водно-солевой раствор ДНК, выделенных из печени здоровых животных и с саркомой 45. Из кривых плавления необлученной и облученной ДНК определяли параметры плавления. В зависимости от длительности облучения (до 110 мин) с резонансными 64,5 ГГц и 50,3 ГГц частотами интервал плавления практически не меняется, а температура плавления ДНК из опухоли саркомы 45 увеличивается на $\approx 1.5^{\circ}\text{C}$. Предполагается, что более сильное увеличение термостабильности опухолевой ДНК по сравнению с ДНК нормы обусловлено ее структурными особенностями.

Нетепловые миллиметровые электромагнитные волны – ДНК – метилирование

Աշխատանքում ուսումնասիրվել է ոչ ջերմային միլիմետրային էՄ ալիքների ազդեցությունը առողջ առնետի լյարդից և սարկոմա-45-ից անջատված ՂՆԹ-ի վրա: Հալման կորեից որոշվել են ճառագայթված և չճառագայթված ՂՆԹ-ի հալման պարամետրերը: Ռեզոնանսային (ջրի մոլեկուլի համար) 64.5 ԳՀց և 54.3 ԳՀց հաճախություններով ճառագայթման դեպքում, կախված ճառագայթման տևողությունից (110 րոպե), հալման միջակայքը (ΔT) գրեթե չի փոփոխվում, իսկ սարկոմա-45-ից անջատված ՂՆԹ-ի հալման ջերմաստիճանը (T_m) մեծանում է $\approx 1.5^{\circ}\text{C}$: Ենթադրվում է, որ ու-ՂՆԹ-ի ջերմակայունության մեծացումը համեմատած ա-ՂՆԹ-ի հետ պայմանավորված է նրա կառուցվածքային առանձնահատկություններով:

Ոչ ջերմային միլիմետրային էլեկտրամագնիսական ալիքներ – ՂՆԹ – մեթիլացում

The influence of non-thermal millimeter electromagnetic waves on DNA from the liver of healthy rats and Sarcoma-45 was studied. The melting parameters of non-irradiated and irradiated DNA were determined from melting curves. The melting range (ΔT) of DNA from the liver of healthy rats and Sarcoma-45 under the influence of resonant (for water molecules) 64.5 GHz and 54.3 GHz frequencies as well as duration of irradiation (110 min) were not altered within the experimental error, while the melting temperature T_m of tumor DNA increases. These results assumed that the increase in thermostability is more profound in case of tumorous DNA than in healthy rat DNA due to structural peculiarity of DNA.

Non-thermal millimeter electromagnetic waves – DNA – methylation

Многочисленные физические факторы внешней среды, играющие важную роль в процессах жизнедеятельности, имеют электромагнитную природу. Электромагнитные поля искусственного происхождения разных частотных диапазонов оказывают выраженное воздействие на живые организмы и находят широкое практическое применение [7,8,10,11]. Сравнительно недавно было показано [4,7], что нетепловые миллиметровые электромагнитные (МЭМ) волны определенных частот обладают противоопухолевой активностью. При облучении крыс с саркомой 37 МЭМ волнами частотой 53,5 ГГц ежедневно в течение 30 мин рост опухоли уменьшается на 33,5%, а степень метилирования ДНК опухоли уменьшается приблизительно в 2,5 раза [4].

Учитывая, что вследствие облучения крыс рост опухоли замедляется и степень метилирования ДНК уменьшается [4,7], в данной работе исследовалось влияние *in vitro* МЭМ волн на термостабильность ДНК, выделенной из опухоли.

Материал и методика. В опытах использовали здоровых и трансплантированных саркомой 45 белых беспородных крыс массой 100-200 г. На 15-е сутки опыта животных декапитировали и извлекли у них печень и опухоль. ДНК из тканей выделяли по модифицированному методу Мармура, что подробно описано в работах [4, 7]. Использовали ДНК, выделенную из печени здоровых крыс (зДНК) и из опухоли крыс с саркомой 45 (оДНК). Содержание белка в зДНК составляло $1,5 \pm 0,2$ %, а в оДНК – $1,3 \pm 0,2$ %. Для зДНК и оДНК соотношение A_{260}/A_{280} находилось в области 1,8-1,9, а соотношение A_{260}/A_{230} между 2,2-2,4. Маточные растворы ДНК были приготовлены в 1мМ раствора NaCl и выдерживались до полного растворения нативной соли ДНК при 0-2°C. Концентрация ДНК в маточном растворе приблизительно 1,5 г/л. Исследуемый раствор был приготовлен из маточного раствора за несколько часов до измерений. Вся процедура осуществлялась при комнатной температуре. Все образцы ДНК изучали в водном растворе, содержащем 0,1М NaCl, 10 мМ Трис, 0,5 мМ ЭДТА, pH=7,4. pH среды измеряли на pH-673-метре при 25°C.

Спектры поглощения и кривые плавления получены на спектрофотометрах SPECORD M40 (Германия). Для снятия кривых плавления (зависимость поглощения при 260 нм от температуры) обычно использовался непрерывный режим нагрева раствора ДНК со скоростью 0,3°C/мин. Измерения проводили в термостатированных ячейках с использованием 10 мм кварцевых кювет с плотно закрывающимися крышками. Точность определения температуры $\pm 0,05^\circ\text{C}$, а оптической плотности – 10^{-4} оптических единиц. Кривые плавления каждого образца снимались по 6-8 раз. Из каждой кривой плавления вычислялись температура (T_m) и интервал (ΔT) плавления, затем эти параметры усреднялись. Среднее квадратическое отклонение оценивалось по формуле

$$\sigma = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{d_i^2}{n-1}},$$

где d_i – отклонение от среднего арифметического для i -го измерения, n – количество измерений. Результаты представлены в виде: среднее значение $\pm$ стандартная ошибка, рассчитанные по n независимым экспериментам.

Облучение проводили в специальном стеклянном сосуде. Растворы сверху закрывались прозрачной для излучения тонкой хлорвиниловой пленкой. Толщина облучения образца приблизительно 1 мм. Для облучения использовались генератор ГИ-142 и ГИ-141 (Россия). Интервал частоты для ГИ-141 составляет 37,5-53,7 ГГц (плотность потока на листе нахождения образца составляет 0,6 мВт/см²), для ГИ-142 – 53,3-78,33 ГГц (плотность потока – 50 мкВт/см²). Растворы облучали резонансными (50,3 и 64,5 ГГц) и нерезонансными (48,3 ГГц) частотами колебаний водных молекулярных структур.

Результаты и обсуждение. Водно-солевые растворы зДНК и оДНК, приготовленные для спектрофотометрических измерений, облучались 30, 40, 60, 90 и 110 мин соответственно. Получены кривые плавления необлученных и облученных с резонансными (64,5 и 50,3 ГГц) и нерезонансной (48,3 ГГц) частотами коле-

баний водных структур зДНК и оДНК. На рис. 1 приведены кривые плавления зДНК и оДНК необлученных и облученных 90 мин с частотой 50,3 ГГц. Как следует из рис. 1, вследствие облучения термостабильность ДНК увеличивается – увеличение больше для оДНК.

Из кривых плавления определены параметры плавления – температура (T_m) и интервал (ΔT). В табл. 1 приведены данные о параметрах плавления зДНК и оДНК, облученных резонансной 50,3 ГГц частотой в зависимости от длительности облучения. Как следует из табл. 1, с увеличением длительности облучения увеличивается T_m оДНК и зДНК: увеличение термостабильности происходит в основном в интервале до 90 мин. При облучениях свыше 90 мин параметры плавления почти не меняются. При облучении 90 мин резонансной частотой 50,3 ГГц T_m зДНК увеличивается. В работе [6] было показано, что МЭМ волны, совпадающие по частоте с резонансными колебаниями водных структур, не поглощаются поверхностным слоем водно-солевых растворов, проникают в более глубокие слои жидкости и приводят к дегидратации присутствующих в растворе ионов. Поэтому наблюдаемые более сильные изменения параметров плавления оДНК, возможно, обусловлены структурными отличиями оДНК по сравнению с зДНК [1,3,9], вследствие чего гидратация оДНК в определенных гиперметилованных участках может сильно отличаться от гидратации остальных участков [2,7]. Вследствие дегидратации присутствующих в растворе ионов Na^+ и более сильной дегидратации оДНК при облучении резонансными частотами, термостабильность оДНК увеличивается больше, что и наблюдалось нами в данной работе (табл. 1 и 2).

Как следует из табл. 2, при облучении нерезонансной частотой 48,3 ГГц параметры плавления также изменяются, однако эти изменения находятся в пределах погрешности эксперимента.

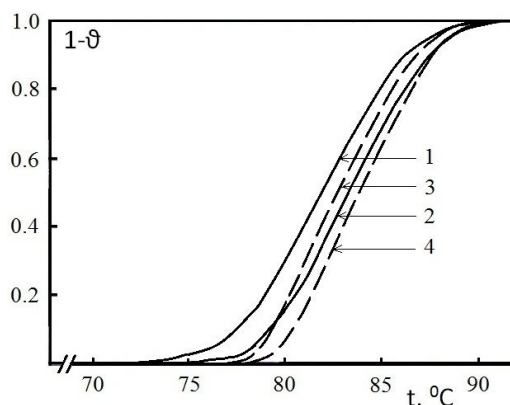


Рис. 1. Кривые плавления необлученных (1,3) и облученных (2,4) 90 мин с частотой 50,3 ГГц для оДНК (1,2) и зДНК (3,4), θ – степень спиральности ДНК.

Известно, что резонансные частоты поглощения для ДНК находятся в области от 2 до 9 ГГц [2,7]. Следовательно, увеличение термостабильности ДНК, вследствие облучения МЭМ волнами резонансных для колебаний молекулярных водных структур частот, обусловлено опосредственным влиянием МЭМ волн на ДНК, вследствие изменения структуры связанной воды: имеет место дегидратация нуклеотидных пар и ионов Na^+ , находящихся в непосредственной близости по отношению к молекуле ДНК, вследствие чего они более эффективно стабилизируют

ют двойную спираль ДНК, причем более сильно для миллиметровых волн резонансных частот (табл. 2).

Таблица 1. Температура и интервал плавления ДНК, выделенных из печени здоровых крыс и опухоли саркомы 45, облученных МЭМ волнами с частотой 50,3 ГГц.

Длительность облучения, мин	оДНК		зДНК	
	$T_m, ^\circ\text{C}$	$\Delta T, ^\circ\text{C}$	$T_m, ^\circ\text{C}$	$\Delta T, ^\circ\text{C}$
0	82.0±0.2	6.6±0.2	83.1±0.1	5.7±0.1
30	82.1±0.2	6.6±0.1	83.0±0.2	5.8±0.1
40	82.2±0.1	6.5±0.2	83.5±0.1	5.7±0.1
60	82.8±0.1	6.3±0.1	83.8±0.2	5.6±0.2
90	83.3±0.2	6.2±0.2	83.9±0.1	5.6±0.2
110	83.2±0.1	6.2±0.2	84.0±0.2	5.6±0.1

Применение: Интервал плавления определяли как разность температур в точках, где оптическая плотность раствора ДНК изменяется от 17 до 83%.

Таблица 2. Температура и интервал плавления ДНК, выделенных из печени здоровых крыс и опухоли саркомы 45, облученных МЭМ волнами в течение 90 мин

Частота облучения, ГГц	оДНК		зДНК	
	$T_m, ^\circ\text{C}$	$\Delta T, ^\circ\text{C}$	$T_m, ^\circ\text{C}$	$\Delta T, ^\circ\text{C}$
0	82.0±0.2	6.6±0.2	83.1±0.1	5.7±0.1
64.5	83.5±0.2	6.2±0.2	84.1±0.2	5.6±0.2
50.3	83.3±0.2	6.2±0.2	83.9±0.1	5.6±0.2
48.3	82.3±0.2	6.5±0.1	83.3±0.2	5.7±0.1

Применение: Значения приведенных данных представляют средние арифметические из 6-и измерений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабаян Ю.С., Гарибян Д.В. Структурные особенности ДНК опухоли саркомы 45. Биофизика, 35, 4, с. 592-596, 1990.
2. Бабаян Ю.С., Маркарян А.Ш., Калантарян В.П., Казарян Р.С., Парсадян М.А., Вардеванян П.О. Воздействие низкоэнергетического миллиметрового электромагнитного излучения на стабильность молекул ДНК. Биофизика, 52, 2, с. 382-384, 2007.
3. Житина Г.П., Скалацкая С.И., Бунина Е.Ф., Круглякова К.Е., Эмануэль Н.М. О природе дефектов вторичной структуры ДНК опухолевых клеток. ДАН СССР, 265, 5, с. 1268-1272, 1982.
4. Калантарян В.П., Бабаян Ю.С., Нерсисян Л.Э., Даниелян И.С., Агаронян А.С., Худавердян Н.В., Гарибян Д.В. Влияние миллиметрового излучения на ДНК опухолевой клетки in vivo. Биомед. Электроника, 12, с. 12-16, 2010.
5. Петросян В.И., Сеницын Н.И., Елкин В.А., Девятков Н.Д., Гуляев Ю.В. Роль резонансных молекулярно-волновых процессов в природе и их использование для контроля и коррекции состояния экологических систем. Биомед. Радиоэлектроника, 5-6, с. 62-114, 2001.
6. Kalantaryan V.P., Hakobyan S.N., Babayan Yu.S. Influence of millimeter wave electromagnetic radiation of nonthermal intensity on density of aqueous solutions. J.Contemporary Phys., 52, 1, p. 58-62, 2017.
7. Kalantaryan V., Martirosyan R., Babayan Yu., Nersesyan L., Stepanyan H. Preliminary results of influence of nonionizing electromagnetic radiation on tumor and healthy DNA and role of water. Amer. J. Med. Biol. Res., 2, 1, p. 18-25, 2014.

8. *Logani M.K., Srabo I., Makar V.R., Bhanushali A., Alekseev S.I., Ziskin M.C.* Effect of millimeter wave irradiation on tumor metastasis. *Bioelectromag*, 2007, v. 27, p. 258-264.
9. *Patha M.D., Rakesh S.* DNA methylation and cancer. *Clinical Oncology*, 22, 22, p. 4632-4642, 2004.
10. *Vardevanyan P.O., Shahinyan M.A., Nerkaryan A.V., Mikaelyan M.S., Darbinyan M.R.* Effect of low intensity EMW EHF on suspension density of rat blood erythrocytes. *Braz. J. of Biol. Sci.*, 2, 4, p. 193-197, 2015.
11. *Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Shahinyan M.A., Mikaelyan M.S.* Influence of millimeter electromagnetic waves on fluorescence of water-saline solutions of human serum albumin. *J. of Appl. Spectr.*, 83, 3, p. 486-489, 2016.

Поступила 09.11.2017



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1(70), 2018

ՀՈՄԵՈՊԱԹԻԱՅԻ ՏԵՍԱԿԱՆ ՀԻՄՆԱԿՈՐՄԱՆ ՀԱՅԵՑԱԿԱՐԳ

Ռ.Յ. ՀԱԿՈԲՅԱՆ

Երևանի Մ. Դերացու անվ. պետական բժշկական համալսարան
rune39@mail.ru

Սույն հոդվածում առաջարկվում է հոմեոպաթիայի տեսական հիմնավորման հայեցակարգ: Ջրի մոլեկուլների կողմից ջրածնական կապերի շնորհիվ լուծված նյութի մոլեկուլները ներառվում են դրանց նկատմամբ տարածական, էլեկտրամագնիսական և այլ տեսակետներից կոմպլեմենտար (ներդաշնակ) հիդրոբյուրեղականության մեջ: Առաջացած կլատրատները (գերմոլեկուլներ) ուժեղ թափահարումից կտրատվում են և մոլեկուլների դուրս գալուց և դրանց վերջնական հեռացումից (սուրացում) հետո որոշ ժամանակ իրենց կայունությունն ու ներդաշնակությունը պահպանած կլատրատների բեկորները օրգանիզմում հեշտությամբ հավաքվում են նույնանման նյութերի մոլեկուլների շուրջը և կլատրատների տեսքով արտաքսում օրգանիզմից:

Հոմեոպաթիա – ջրածնական կապ – կոմպլեմենտարություն – կլատրատներ

В данной статье предлагается концепция теоретического обоснования гомеопатии. Молекулы воды с помощью водородных связей комплементарно ассоциируются вокруг молекул растворенного вещества, создавая гидрокристаллические решетки – клатраты (супрамолекулы). После сильного встряхивания решетки разрушаются, а после конечного разбавления в растворе остаются только комплементарные “осколки” гидрорешеток, сохранившие некоторую устойчивость. Они легко окружают подобные молекулы и в виде клатратов выводят из организма.

Гомеопатия – водородная связь – комплементарность – клатраты

The paper presents the concept of theoretical justification of homeopathy. Water molecules are associated around the solute molecules by means of hydrogen bounds forming complementary hydro-crystalline lattices – clatrates (supramolecules). After active shaking the lattices are destroyed and after a final dilution only complementary fragments of the hydro- lattices, which maintain a certain resistance, remain in the solution. They easily surround similar molecules and discharge them from the organism in the form of clatrates.

Homeopathy – complementarity – clatrates

Հիպոկրատը մ.թ.ա. մոտ 400 թ. առաջարկում էր *մարդախոտի* (мандрагора) արմատի փոքր քանակներ մոլազարության (мания) բուժման համար, հաշվի առնելով, որ մեծ դոզայի դեպքում այդ արմատը առաջացնում է նույնանման ազդեցություն [10]:

Պարացելսը (1493-1541) պնդում էր, որ «մարդուն բուժում են նրա հիվանդության պատճառ հանդիսացող նյութի փոքր քանակները» [9]:

Հոմեոպաթիայի (հուն. *homeo*–նման, *патия* – հիվանդություն) հիմքում ընկած է Սա-մուել Հանեմանի (1755-1843) «նմանը նմանով» (լատ. *similia similibus curantur*) բուժման կոնցեպցիան [5]:

Հոմեոպաթիկ պատրաստուկների համար հումք են հանդիսանում այն նյութերը, որոնք խիստ փոքր քանակներով օրգանիզմ ներմուծելիս առաջացնում են տվյալ հիվանդության ախտանիշները: Դրանք կարող են լինել հանքանյութեր, բույսեր, թույլներ և այլն:

Դասական հոմեոպաթիկ ֆարմակոպեայում ընդգրկված են մոտ 1200 դեղանուն: Հոմեոպաթիան հակադրվում է ռացիոնալ բժշկության սկզբունքներին:

Հոմեոպաթիան ունի մոտ 200 տարվա պատմություն, սակայն մինչև այժմ չունի տեսական հիմնավորում: Համարվում է, որ հոմեոպաթիայի սկզբունքները չեն համընկնում առողջ և հիվանդ օրգանիզմների գործունեության գիտական պատկերացումների հետ: Հոմեոպաթիկ դեղերի և պլացեբոյի համեմատական կլինիկական փորձարկումների (англ. meta-analysis) արդյունքները հաճախ չեն տարբերվել, չնայած զուգահեռ նշում են նաև, որ փորձերի մեթոդները հավաստի չեն եղել [11]:

Հոմեոպաթիայում կիրառում են նյութի տասնորդական (1:10) կամ հարյուրերորդական (1:100) նոսրացումները, որոնք նշանակվում են D և C տառերով: Երեք անգամ կրկնված տասնորդական նոսրացումը (1:1000) նշանակում են «3D»-ով, 12 անգամ կրկնվածը (1:10²⁴)՝ «12C»-ով: Հաշվարկները ցույց են տալիս, որ 12C և ավելի մեծ ինդեքսով նոսրացումների դեպքում միջավայրում նյութի անգամ մեկ մոլեկուլի գտնվելու հավանականությունը գերո է [1]: Ներկայում օգտագործվում են հիմնականում 3D-ից – 30D նոսրացումները:

Բացահայտել պատրաստուկում այդ նյութերի առկայությունը նույնիսկ ժամանակակից մեթոդներով հնարավոր չէ: Այդ պատճառով հոմեոպաթիան համարվում է կեղծ գիտություն, խաբեություն, առավել ևս որ դրանով սկսեցին զբաղվել շահամոլները, խաբեբաները [3]: Հանեմանը պնդում էր, որ իր պատրաստուկներում պարունակվում է դեղի ոգին (Էներգիան):

Հոմեոպաթներն արդարանում են «ջրի հիշողության» գաղափարով: Այլ բացատրություն չկա: Սակայն ժամանակակից գիտության տվյալներով ջրի ֆիզիկա-քիմիական հատկությունները բացառում են ջրի հիշողության գաղափարը [4]:

Բազմաթիվ երկրներ պարբերաբար հրաժարվում են հոմեոպաթիայից, սակայն շատ տեղերում այն համարվում է հեղինակավոր բժշկություն:

Հոմեոպաթիայի աքիլեսյան գարշապարը «ջրի հիշողությունն է» [6]:

Բոլոր փաստարկները, ի պաշտպանություն ջրի հիշողության, հիմնվում են Չենինի դոկտորական դիսերտացիայում [2] նշված առեղծվածային բացատրությունների վրա այն է՝ ելային լուծույթում գտնվող նյութը ունի որոշակի Էներգիական կառուցվածք (энергоструктуру) և որոշակի ձևով ազդում և կողավորում է լուծիչի Էներգակառուցվածքը: Բազմակի թափահարելիս և նոսրացնելիս նյութի Էներգիական կողը փոխանցվում է լուծիչի հաջորդ բաժնին և կողի միջոցով տեղի է ունենում բուժական էֆեկտի (?) փոխանցում: Նյութը լուծույթում թափահարելիս ջրի մոլեկուլները շարվում են որոշակի կարգով և ոնց որ թե հիշում են ելանյութի ինդիվիդուալ ինֆորմացիան: Բայց ինչպես հասկանալ մի նյութի բուժական էֆեկտը, երբ այն օրգանիզմ է տրվել նույն տիպի հիվանդության ախտանիշներ առաջացնելու նկատառումով: Դիսերտացիայում միակ ռացիոնալ պահն այն է, որ ջուրն առաջացնում է որոշակի չափերի և կյանքի տևողությամբ կառուցվածքային տարրեր:

«Ջրի հիշողության» կողմնակիցները վկայակոչում են ճապոնացի Էմոտոյի գրքերը [12], որոնք գիտական մամուլում չեն հրատարակվել:

Ըստ պաշտոնական գիտական մամուլի՝ ջուրը շնորհիվ ջրածնական կապերի լուծված նյութի շուրջն առաջացնում է որոշակի ձևով կլաստերներ և նոսրացնելիս նյութը հեռանում է, իսկ ջրի դիպոլները մնում են իրար հետ կապված կլաստերների ձևով, որը «ջրի հիշողությունն է»?: Բայց ինչպես հիմնավորել բուժման պրոցեսը հայտնի չէ, առավել ևս, որ լուծված նյութը խիստ նոսրացման հետևանքով հեռանում է, իսկ դրա հիշողությունը մնում է: Տրամաբանական է արդյո՞ք, որ ոչ թե նյութը, այլ դրա հիշողությունն է ազդում: Ինչպե՞ս պատկերացնել բուժման պրոցեսը:

Սովորաբար հոմեոպաթները հաջողությամբ բուժում են մարսողական, սիրտ-անոթային համակարգերի, ալերգիաների, մաշկային և թոքային, մանկական, սկսվող դիաբետիկ հիվանդությունները: Ճիշտ կիրառման դեպքում հոմեոպաթիկ միջոցները կարող են լինել անփոխարինելի, հատկապես բարդ և անհասկանալի հիվանդությունների դեպքում և, բնական է, լրիվ անվտանգ են:

Փորձերը ցույց են տվել, որ հոմեոպաթիան առավել արդյունավետ է կենդանիների և ցածր տարիքի երեխաների բուժման դեպքում: Այս փաստը թույլ է տալիս ենթադրել, որ հոմեոպաթիան ներշնչման ու պլացեբո էֆեկտներով բացատրելի բացառվում է: Առավել ևս, որ պլացեբո երևույթը վերարտադրելի չէ:

Հոմեոպաթիայի երևույթի բացատրման ամենատարածված տեսություններից մեկի հիմքում ընկած է «Նյութի սիստեմատիկ հիշողության հիպոթեզը», համաձայն որի ջուրը պահպանում է բուժանյութի ինֆորմացիան նույնիսկ բազմակի նոսրացումներից հետո:

Հոդվածում նույնիսկ ենթադրվում է, որ հոմեոպաթիկ լուծույթների «կոմպլեքս դինամիկական համակարգերում» պահպանվում են նյութի էներգիան ու դրա մասին ինֆորմացիան, և լուծույթում մոլեկուլային համակարգի նյութական կոնցենտրացիայի նվազմանը համապատասխան մեծացնում են նյութի կոնցենտրացիան: Մեկ այլ հոդվածում հոմեոպաթիայի երևույթը աշխատում են բացատրել ռադիոալիքների օգնությամբ, որոնք հեշտ թափանցում են օրգանիզմի ջրի միջով [8, 13-15]:

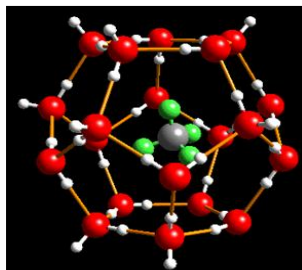
«Human Toxicology» հեղինակավոր գիտական ամսագրում տպագրված է արտակարգ կարևոր հոդված, որտեղ ուսումնասիրված է արսենի (As) մահացու դոզաներով թուճավորված առնետների օրգանիզմից թույլի արտաքսման արդյունքները արսենի միկրոդոզաների օգնությամբ [7]: Փորձերը կատարվել են տարբեր Նոսրացումների արդյունավետությունը ստուգելու և «պլացեբո» էֆեկտի հետ համեմատելու նպատակով: Հոմեոպաթիկ դեղերը արդյունավետությամբ ու վերարտադրելիությամբ անհամեմատ գերազանցել են «պլացեբո» էֆեկտը: Սակայն տվյալ հոդվածը կարևոր է այն տեսակետից, որ ապացուցում է ոչ թե թունազերծման երևույթը, այլ հոմեոպաթիկ դեղանյութերի որոշ Նոսրացումների դեպքում օրգանիզմ ներմուծված թույլի (As_2O_3 , այլ ոչ թե դրա ձևափոխությունների) արտաքսման անհամեմատ արդյունավետությունը: Այսինքն, ջուրը, որը պահում է նյութի ինֆորմացիան, ոչ թե դրան ենթարկում է փոխարկման, այլ արտաքսում է օրգանիզմից: Ինչպե՞ս հասկանալ:

Պրոցեսն ավելի պարզ է, քան թվում է: Ջուրը խիստ կարևոր դեր է կատարում բնության և մարդու կյանքում: Ջուրը Երկրի մակերեսի և մարդու մարմնի զանգվածի մոտ 70%-ն է, օրգանիզմի միջավայրը և պահպանը: Այն վճռորոշ դեր է կատարում օրգանիզմում ընթացող բոլոր պրոցեսներում: Առողջ մարդու մեջ գոյություն ունի ջրային բալանս և տվյալ օրգանիզմին բնորոշ ջրային կառուցվածք: Ժամանակին մարդու ջրային կառուցվածքը ևս արյան խմբի նման կգրանցեն ծննդականում:

Ջուրն օժտված է մեզ հայտնի ու անհայտ բազմաթիվ հատկություններով, այդ թվում նաև մեծ զգայունությամբ և ազդեցիկությամբ բոլոր, հատկապես էլզոգեն նյութերի նկատմամբ:

Ոչ գոլորշի վիճակում ջրի բանաձևն արտահայտվում է $(H_2O)_n$ -ով, որտեղ n -ի մեծությունը կախված է ճնշումից, ջերմաստիճանից, լուծված նյութի բնույթից, էլեկտրամագնիսական դաշտերի առկայությունից և այլ գործոններից:

Ջրածնական միջմոլեկուլային (ոչ կովալենտային) կապերի շնորհիվ n թվով ջրի մոլեկուլների ասոցիացիան հետևանքով միջավայրում գտնվող ցանկացած նյութի մոլեկուլների շուրջն առաջանում են տարբեր ձևերի ու չափերի՝ այդ մոլեկուլներին տարածական, էլեկտրա-մագնիսական, ֆիզիոլոգիական և այլ տեսակետներից կոմպլեմենտար (ներդաշնակ) հիդրոբյուրեղավանդակներ և ռեցեպտոր-սուբստրատ տեսքով վերածվում են գերմոլեկուլների (կլատրատներ, супрамолекулы, տես նկ.): Համաշխարհային օվկիանոսի խորքերում անաերոբ մանրէների գործունեության արդյունքում կենդանական և բուսական մնացորդների քայքայումից առաջացած գազերը (CH_4 , CO_2 , H_2S , C_2H_6 , C_3H_8 ...) դուրս չեն գալիս մակերևույթ, այլ որոշակի ճնշման (օվկիանոսի խորության) և ջերմաստիճանի պայմաններում ներառնվում են ջրի մոլեկուլների տարբեր տեսակի ասոցիացիաներից առաջացած կոմպլեմենտար հիդրատային բյուրեղավանդակներում՝ վերածվելով գազային կլատրատների: Օվկիանոսի ընդերքում գերմոլեկուլների տեսքով մեթանի պարունակությունը բազմաթիվ անգամ գերազանցում է Երկրի վրա եղած վառելանյութի պաշարները և մեծ վտանգ է ներկայացնում Երկրի գլոբալ տաքացման դեպքում:



Նկ.1. Մեթանի մոլեկուլը ջրի բյուրեղավանդակում

Ըստ **Հանեմանի**՝ դեղի ազդման ուժը մեծանում է խառնուրդի պարբերաբար ինտենսիվ թափահարման («պոտենցում» կամ «դինամիզացում», նույնիսկ անոթը հարվածելով սեղանին) և խիստ նոսրացման հետևանքով:

Փորձենք հիմնավորել Հանեմանի դրույթները:

Ամեն նոսրացումից առաջ լուծույթի ինտենսիվ խառնման հետևանքով «ջարդվում» են ջրում գտնվող նյութի մոլեկուլների շուրջն առաջացած կլատրատային կառուցվածքները և 12C* ինդեքսով նոսրացված խառնուրդը, որը չի պարունակում անգամ մեկ մոլեկուլ լուծված նյութ, օրգանիզմ ներմուծելիս «ջարդման» հետևանքով առաջացած և նյութի մոլեկուլների նկատմամբ ներդաշնակությունը պահպանած որոշակի կայունությամբ կլատրատային բեկորները մեծ արդյունավետությամբ շրջապատում և կլատրատների տեսքով օրգանիզմից հեռացնում են այնտեղ գտնվող նույնանման էլզոգեն մոլեկուլները:

Կոֆեինը հայտնի է իր գրգռիչ, խթանող հատկություններով, սակայն հոմեոպաթիկ դեղատներում գերցածր կոնցենտրացիաներով այն վաճառվում է որպես հանգստացնող, քնաբեր միջոց: Խիստ նոսրացված պատրաստուկը գործնականորեն կոֆեին չի պարունակում: Խառնուրդը հարստացված լինելով նախնական կոֆեինի կողմից ինտենսիվ խառնման և նոսրացման պայմաններում ստեղծված որոշակի կայունությամբ կլատրատների կոմպլեքսներով, օրգանիզմում գտնվող տարածական, էլեկտրամագնիսական, ֆիզիոլոգիական և այլ տեսակետներից կոֆեինանման նյութերը ընկալիչ-սուբստրատ կոմպլեքսնախաղության շնորհիվ, վերածում են կլատրատների և արտաքսում օրգանիզմից:

Պրոբլեմը միայն հոմեոպաթների կողմից էլզոգեն սուբստրատի ճիշտ ընտրությունն է: Ախտածինների նմանությամբ նյութերի ճիշտ բացահայտումը կամ դիզայնը կնպաստեր հոմեոպաթիայի առաջընթացին: Գիտության ներկայի մակարդակը ի գործ է այդ իրականացնել:

Առաջարկվող հայեցակարգով կարելի է պատասխանել հոմեոպաթիային վերաբերող բոլոր հարցերին և հիմնավորել թվացյալ առեղծվածային երևույթները, ինչը կնպաստի այդ գիտության առաջընթացին: Կլատրատային տեսությամբ իմունիտետի գաղափարի բացատրությունը ևս առավել համոզիչ է, ինչը հաստատում է ջրի գերակա դերը այդ գործընթացում: Պատահական չէ, որ հիվանդության դեպքում օգնում է մեծ քանակի հեղուկների ընդունումը:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Бочков А.* Снова о разбавлениях. Троицкий вариант Наука, №93, с.15.(6.12.2011, 16.08.15).
2. *Зенин С.В.* Структурированное состояние воды как основа управления поведением и безопасностью живых систем (дисс. докт. биол. наук). М., 1999.
3. *Коган Д.А.*, Современная гомеотерапия – знахарство плюс шарлатанство, с. 216, 1964.
4. Комиссия по борьбе с лженаукой и фальсификацией научных исследований РАН. Меморандум №2. О лженаучности гомеопатии. Приложение №1. Ответы на часто задаваемые вопросы о гомеопатии и доводы в ее пользу. 6 февраля 2017.
5. Органон врачебного искусства, Изд. “Симилия”, 6-е издание, 1842 (1810, 1829, 1833...), 1921.
6. РАН. Меморандум №2. О лженаучности гомеопатии. Приложение №4. О памяти воды, 6.02. 2017.
7. *Cazin J.C. et al.*, "A Study of the Effect of Decimal and Centesimal Dilution of Arsenic on Retention and Mobilization of Arsenic in the Bat," Human Toxicology, July 1987.
8. *Coulter H.L.*, Homoeopathic Science and Modern Medicine: The Physics of Healing with Microdoses. Berclay : North Atlantic Books, 1981.
9. *Hargrave J.G.*, Paracelsus (German-Swiss physician), Encyclopædia Britannica. Check. 24.03 2009.
10. *Hemenway Henry Bixby* "Modern Homeopathy and Medical Science", JAMA: The Journal of the American Medical Association, XXII, 11, 367, 1894.

11. Liberaty A, Altman DG, Tetzlaff J et al. "The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration». *PLoS Medicin.*, 2009.
12. *Masaru Emoto, "The Messages from Water" 1, 2 u "Water knows the answer". Բրիտանացիք Մասարա Էմոտոյի համարում են կեղծ գիտնական "Википедии": http://en.wikipedia.org/wiki/Masaru_Emoto*.
13. Resch G., Gutmann V. Scientific Foundations of Homoeopathy. Munich: Bartel and Bartel, 1987.
14. Scofield A.M. "Experimental Research in Homeopathy: A Critical Review." *British Homoeopathic Journal*, 73 (VII-VIII 1984): 161-180, 211-226, 1984.
15. Ullman D. ed. Monograph on Homeopathy Research, vols.1 and 2 Berkley: Homoeopathic Educational Services, 1981, 1986.

Ստացվել է 16. 02.2018



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1(70), 2018

ԱՇՈՏԱԿԱՆ ՊԱՐԱՐՏԱՆՅՈՒԹԵՐԻ ԱՃՈՂ ԶԱՓԱՔԱՆԱԿՆԵՐԻ ԿԻՐԱՌՄԱՆ ԱՇԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՀԱՃԱՐԻ ԲԵՐՔԱՏՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ ՍԻՍԻԱՆԻ ՏԱՐԱԾԱԾՐՋԱՆԻ ԱՆՋՐԴԻ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Ռ.Ռ. ՄԱՆՈՒԿՅԱՆ, Ա.Բ. ՇՈՂՈՒՆՑ

Հայաստանի ազգային ագրարային համալսարան,
Սիսիանի մասնաճյուղ
ghazaryan_67@inbox.ru

Ուսումնասիրվել է $P_{60}K_{60}$ ֆոնի վրա ազոտի 30, 60, 90 և 120 կգ/հա նորմաների կիրառման ազդեցությունը հաճարի *Triticum boeoticum* բույսերի աճի, զարգացման, բերքատվության և բերքի որակական որոշ ցուցանիշների վրա:

Պարզվել է, որ Սիսիանի անջրդի շագանակագույն, սննդատարրերով աղքատ հողային պայմաններում $P_{60}K_{60}$ ֆոնի վրա ազոտի կիրառման լավագույն նորման 60 կգ/հա-ն է:

Հաճար – հանքային պարարտանյութեր – աճ – զարգացում – բերք

Изучалось влияние возрастающих норм азотных удобрений на фоне $P_{60}K_{60}$ на рост, развитие, урожайность и некоторые качественные показатели полбы *Triticum boeoticum*.

Установлено, что для каштановых, богарных, слабо обеспеченных питательными элементами почвах на фоне $P_{60}K_{60}$ наилучшей нормой азота является 60 кг/га.

Полба – минеральные удобрения – рост – развитие – урожайность

The influence of increasing nitrogen fertilizer rates against $P_{60}K_{60}$ on growth, development, yield and some qualitative indicators of common rye *Triticum boeoticum* was studied.

It was revealed that in chestnut, rain-fed, nutrient-poor soils on the background of $P_{60}K_{60}$, the best nitrogen norm is 60 kg/ha.

Fertilizer hollow – mineral fertilizers – growth – development – productivity

Հաճարը (*Triticum boeoticum*) համարվում է կարևոր հատիկային, պարենային, կերային մշակաբույս, որի մշակումը Հայաստանում ունի հազարամյակների պատմություն: Հայաստանում հաճարի մշակման հիմնական տարածաշրջաններից են Սիսիանը և Գորիսը, որոնց բաժին է ընկնում 33 ընդհանուր ցանքատարածությունների 60-70 %-ը: Հաշվի առնելով հաճարի կարևոր առանձնահատկությունները՝ չորադիմացկունությունը, սննդատարրերի նկատմամբ սակավ պահանջկոտությունը, դրա մշակման համար հաճախ հատկացվում են սննդատարրերից համեմատաբար աղքատ հողակտորներ, ինչպիսիք զգալի տարածություններ են կազմում նաև Սիսիանի տարածաշրջանում: Ակնհայտ է, որ այդպիսի հողերում առանց անհրաժեշտ ագրոտեխնիկական միջոցառումների, այդ թվում պարարտանյութերի կիրառման, հնարավոր չէ մշակաբույսերից ստանալ համեմատաբար բարձր և տնտեսապես արդարացված բերք:

Նկատի ունենալով վերոհիշյալը՝ մեր առջև խնդիր է դրվել, դաշտային փորձերի ու լաբորատոր հետազոտությունների միջոցով պարզել $P_{60}K_{60}$ ֆոնի վրա ազոտական պարարտանյութերի տարբեր չափաքանակների ազդեցությունը հաճարի բույսերի աճի, բերքատվության և հատիկի որակական ցուցանիշների վրա:

Նյութ և մեթոդ: Դաշտային փորձերը կատարվել են Բռնակոթ համայնքի շագանակագույն, խճաքարային, միջակ հզոր, թույլ հումուսային, կարբոնատային հողերի վրա, անջրդի պայմաններում: Դաշտային փորձերը կատարվել են հետևյալ սխեմայով.

1. Ստուգիչ (առանց պարարտացման),
2. $P_{60}K_{60}$ (Ֆոն),
3. $\Phi n+N_{30}$,
4. $\Phi n+N_{60}$,
5. $\Phi n+N_{90}$,
6. $\Phi n+N_{120}$

Փորձերը կատարվել են երեք կրկնողությամբ, փորձամարզերի 50 մ^2 ($5 \text{ մ} \times 10 \text{ մ}$) մակերեսով:

Փորձերի տեղաձևումից հետո երկու կրկնողության (I և II) բոլոր տարբերակներից վերցվել են միջին հողանմուշներ (0-25 սմ) փորձատեղամասի հողերի սննդատարրերով միատարրությունը որոշելու նպատակով (աղ. 1):

Աղյուսակ 1. Փորձատեղամասի հողերի ֆիզիկաքիմիական և ագրոքիմիական ցուցանիշներ

Հորիզոնը	Հզորությունը, սմ	Ֆիզիկական կազմ, %	CO_2 , %	pH, H_2O	Կլանված կատիոններ մգ/էկվ 100գ հողում		Հումանը, %	Շարժուն սննդատարրեր, մգ 100 գ հողում		
					Ca	Mg		N	P_2O_5	K_2O
A վար	0-24	48.4	2.4	7.6	29.4	4.8	2.2	3.6	5.4	40.4
AB	24-38	43.9	2.4	7.6	28.6	5.6	1.9	3.6	5.4	38.6
B	38-52	44.0	2.8	7.8	28.0	3.8	1.6	3.2	5.0	38.6
BC	52-66	38.1	3.2	8.2	27.2	3.6	1.2	2.4	4.8	42.0
C	66 >	35.0	3.4	8.2	27.0	3.2	0.8	-	-	-

Բացի այդ դրվել է մեկ հողափուս միջև C հորիզոնը և յուրաքանչյուր հորիզոնից վերցվել է նմուշ պարզելու ֆիզիկաքիմիական և ագրոքիմիական հատկությունները: Հանքային պարարտանյութերը հող են ներմուծվել ցանքից առաջ, կրկնվարի տակ:

Վեգետացիայի ընթացքում կատարվել են ֆենոլոգիական դիտարկումներ և կենսամետրիկ չափումներ: Բերքահավաքը կատարվել է փորձամարզի բերքը հավաքելու և կշռելու միջոցով: Վերցվել են խրճանմուշներ հաճախի բերքի տարրերի կառուցվածքը որոշելու համար:

Արդյունքներ և քննարկում: Փորձադաշտից ընտրված հողանմուշների վերլուծության արդյունքները ցույց են տվել, որ փորձատեղամասի հողերն ունեն ծանր կավավազային մեխանիկական կազմ (ֆիզիկական կազմ՝ 49.5 %), կարբոնատային են, որոնք սկսվում են հողի մակերեսից (CO_2 -2.4%), միջավայրի ռեակցիան թույլ հիմային է (pH-7.6), կլանված կատիոնների գումարը (Ca+Mg) կազմում է 34.2 մգ/էկվ 100 գ հողում, թույլ հումուսային են (2.2%), թույլ են ապահովված հեշտ հիդրոլիզվող ազոտով, միջակ շարժուն ֆոսֆորով և լավ՝ փոխանակային կալիումով. համապատասխանաբար 3.6, 5.4 և 40.4 մգ/100գ հողում (աղ. 1):

Հաճախի մշակման ագրոտեխնիկական մի շարք հարցեր Հայաստանի Հանրապետությունում այս կամ այն չափով ուսումնասիրվել են [1-3], իսկ Սիսիանի տարածաշրջանում որևէ ուսումնասիրություն չի կատարվել: Այդ առումով նշված տարածքում հաճախի ցանքատարածությունների պարարտացման հարցերի ուսումնասիրությունն արդիական է, ունի կարևոր գիտական և կիրառական նշանակություն:

Մեր կողմից 2012-2014 թթ. ընթացքում $P_{60}K_{60}$ ֆոնի վրա փորձարկվել է ազոտի աճող չափաքանակների (30, 60, 90, 120 կգ/հա) կիրառման ազդեցությունը հաճախի աճի, զարգացման և բերքատվության վրա:

Վեգետացիայի ընթացքում կատարված ֆենոլոգիական դիտարկումների և կենսամետրիկ չափումների արդյունքները ցույց են տալիս, որ $P_{60}K_{60}$ ֆոնի վրա ազոտական պարարտանյութերի կիրառման չափաքանակների ավելացմանը զուգընթաց, ավելանում են նաև բույսերի բարձրությունը ըստ փուլերի (խողովակակալում, հասկակալում, սնուցում) ցողունների քանակը 1 մ^2 -ում (ընդամենը, հասկակիր) թփակալման աստիճանը

(աղ. 2): Ընդ որում առավելագույն արդյունք ստացվել է ազոտի 60 և 90 կգ/հա նորմաների կիրառման դեպքում:

Աղյուսակ 2. Ազոտի աճող չափաքանակների կիրառման ազդեցությունը հաճարի բույսերի աճի ու զարգացման ցուցանիշների վրա

Տարբերակները	Բույսերի բարձրությունը, սմ			Ցողունների թանակը 1մ ² վրա, հատ		Թփակավման աստիճանը	
	խորվակավման վրա	Հասկավման վրա	Լրիվ հատվածում	Ընդհանուր	Հասկավոր	Ընդհանուր	Հասկավոր
Ստուգիչ /առ. պար./	28.7	60.7	85.3	749.3	420.7	2.6	1.5
P ₆₀ K ₆₀ /Ֆոն/	30.0	65.0	88.1	787.0	482.3	2.7	1.5
Ֆոն+ N ₃₀	34.2	68.0	95.4	825.0	520.7	2.9	1.8
Ֆոն+ N ₆₀	38.7	71.2	100.2	857.7	555.7	3.0	2.1
Ֆոն+ N ₉₀	41.2	73.8	100.8	917.0	568.0	3.2	2.4
Ֆոն+ N ₁₂₀	41.5	74.5	101.3	939.0	569.0	3.3	2.4

Նման արդյունավետություն ստացվել է նաև հաճարի բերքի տարրերի կառուցվածքային ցուցանիշներում (հասկիկների բերքը 1մ²-ում և հեկտարով, հատիկների ելը հասկիկից, հատիկ : ծղոտ հարաբերությունը և ծղոտի բերքը): Բերված տվյալները ցույց են տալիս (աղ. 3), որ ինչպես միայն ֆոսֆորական և կալիումական պարարտանյութերի, այնպես էլ ազոտականի տարբեր նորմաների կիրառումը էականորեն նպաստել է հաճարի հասկիկների և հատիկների բերքատվությանը:

Այսպես, միայն P₆₀K₆₀ (Ֆոն) տարբերակում ստուգիչի նկատմամբ հասկիկների ավելացումը կազմել է 28 գ/մ² կամ 2.8 գ/հա: Ազոտական պարարտանյութերի չափաքանակների աստիճանական ավելացումն ուղեկցվել է բերքատվության բարձրացմամբ N₆₀ և N₉₀ տարբերակներում, հավելումը կազմել է համապատասխանաբար 68,0 և 73.0 գ/մ² (6.8 և 7.3 գ/հա): Որոշ չափով ստուգիչի նկատմամբ ավելացել է նաև հասկիկների ելը հասկիկից հասնելով 68.2-70.5 %-ի: Հատիկ : ծղոտ հարաբերակցությունը ստուգիչի նկատմամբ չնչին չափով նվազել է, ինչը ցույց է տալիս, որ հասկը ծղոտի նկատմամբ մեծացել է: Նույն օրինաչափությամբ մեծացել է նաև ծղոտի բերքատվությունը, կազմելով 2.3-5.7 գ/հա:

Աղյուսակ 3. Հանքային պարարտանյութերի ազդեցությունը հաճարի բերքի տարրերի կառուցվածքային ցուցանիշների վրա

Տարբերակները	Հաճարի հասկիկների բերքը, գ/մ ²	Հասկիկների միջին բերքը, գ/հա	Հատիկների ելը հասկիկից, %	Հատիկի միջին բերքը, գ/հա	Հատիկ : ծղոտ հարաբերությունը	Ծղոտի բերքը, գ/հա
1. Ստուգիչ /առ. պար./	244	24.4	64.0	15.7	1.16	18.2
2. P ₆₀ K ₆₀ /Ֆոն/	272	27.2	65.7	18.1	1.12	20.3
3. Ֆոն+ N ₃₀	293	29.3	68.2	20.0	1.10	22.0
4. Ֆոն+ N ₆₀	312	31.2	70.2	22.1	1.05	23.2
5. Ֆոն+ N ₉₀	317	31.7	70.2	22.4	1.07	24.0
6. Ֆոն+ N ₁₂₀	314	31.4	70.5	22.2	1.08	24.0

Նման արդյունքներ ստացվել են նաև հաճարի որակական ցուցանիշներում (չոր նյութ, սպիտակուց, հազար հատիկի զանգված): Ստուգիչի հետ համեմատած նշված 3 ցուցանիշներն էլ ավելացել են (աղ. 4):

Աղյուսակ 4. Ազոտի տարբեր չափաքանակների կիրառման ազդեցությունը հաճարի բերքատվության և հատիկի որակական որոշ ցուցանիշների վրա

Տարբերակները	Հատիկի բերքը g/հա	Բերքի հավելում		Բերքի որակական ցուցանիշները		
		g/հա	%	չոր նյութ, %	հում պրոտեին, %	1000 հատիկի զանգվածը, գ
1. Ստուգիչ առ. պար.	15.7	-	-	88.43	13.41	33.2
2. P ₆₀ K ₆₀ /ֆոն/	18.1	2.4	15.3	89.95	14.05	34.0
3. Ֆոն+ N ₃₀	20.0	4.3	27.4	91.10	14.70	35.4
4. Ֆոն+ N ₆₀	22.1	6.4	40.8	91.33	15.44	38.1
5. Ֆոն+ N ₉₀	22.4	6.7	42.7	90.66	14.50	38.9
6. Ֆոն+ N ₁₂₀	22.2	6.5	41.4	90.36	14.30	38.4

Հաշվի առնելով այն հանգամանքը, որ ազոտի 60, 90 և 120 կգ/հա չափաքանակների կիրառումից հաճարի կառուցվածքային ցուցանիշները, բերքատվությունը, ինչպես նաև որակական կազմը էական փոփոխություններ չեն կրել, ուստի կարելի է եզրակացնել, որ Սիսիանի տարածաշրջանի շագանակագույն, սևնդատարրերից, ազոտից աղքատ, անջրդի պայմաններում հաճարի պարարտացման օրինակելի չափաքանակը N₆₀P₆₀K₆₀-ն է: Այն ապահովում է ստուգիչի նկատմամբ 6.4 g/հա կամ 40.8 % բերքի հավելում:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Խաչատրյան Ա.Ռ.* Ագրոնոմիական հետազոտությունների մեթոդներ: Երևան, «Ասողիկ» հրատարակչություն, 238 էջ, 2002:
2. *Մովսիսյան Ե.Մ.* Ագրոքիմիայի հիմունքներ: Երևան, «Հայաստան» հրատարակչություն, 468 էջ, 1971:
3. *Հովհաննիսյան Ս.Կ.* Ազոտական պարարտանյութերի ազդեցությունը հաճարի բերքատվության վրա Հայաստանի Հանրապետության պայմաններում: ՀԳԻ գիտական աշխատությունների ժողովածու, պրակ 52, Երևան, էջ 47-49, 1994:

Ստացվել է 26.10.2017



Биолог. журн. Армении, 1 (10), 2018

АВETИСЯН В.Е.

**“БИБЛИОГРАФИЯ НАУЧНЫХ РАБОТ ПО МИКОЛОГИИ В
РЕСПУБЛИКЕ АРМЕНИЯ (1889-2014)”**

(Авторы: Осипян Л.Л., Нанагюлян С.Г., Согоян Е.Ю.)

Ереван, 2017, 480 стр.

Биологическую общественность Армении следует поздравить с выходом в свет книги “Библиография научных работ по микологии в Республике Армения (1889-2014)” ; 2017, Издательство Ереванского государственного университета.

На 480 страницах сборника, по скрупулезно разработанной схеме, в 27 главах двух основных разделов (“Разнообразие грибов Армении по субстратам, таксономическим, экологическим и функциональным группам” и “Морфология, экология и биология грибов”) изложена библиография 3261 публикаций, содержащих широкий спектр сведений, касающихся грибов Армении, их системы, филогении, биохимии, экологии, практического значения. Перечень публикаций приведен в алфавитном порядке фамилий авторов. Впервые, по предложенной академиком НАН РА Л.Л. Осипян системе, собраны воедино грибные и грибоподобные организмы (в том числе дрожжи, возбудители микозов человека и животных, лишайники – лишенизированные грибы, деструкторы промышленных материалов), ранее не укладывавшиеся в рамки традиционной микологии, которая долгое время рассматривалась в рамках ботанической науки и выделялась в самостоятельные специальности, такие как фитопатология, медицинская микология, пищевая микробиология, микробиологическая токсикология и др. Особо ценно, что помимо научных статей и монографий в “Библиографию” включены авторефераты диссертаций, материалы конференций и съездов, базы данных, гербарии и коллекции культур, авторские свидетельства и другая ценная информация.

Объем информации, содержащийся в “Библиографии”, настолько многогранен, что может быть использован не только микологами, но и специалистами других областей, поскольку информация, выделенная по функциональным признакам чрезвычайно актуальна, как например – микобиота, загрязняющая пищевые продукты и корма; микобиота, загрязняющая лекарственные препараты и их сырье; микобиота пергамента и бумаги, весьма актуальная для сохранения фондов древних рукописей, микобиота деструкторов промышленных материалов, включая полимеры космической техники и др.

Обращает на себя внимание исходная дата “Библиографии” – 1889 год, что несомненно повышает ценность настоящей работы, ввиду труднодоступности ранних первоисточников для современного исследователя.

По приведенным в “Библиографии” трудам становится возможным документально составить историю развития различных направлений микологии, опосредованно через исследование грибов, поражающих представителей флоры восстановить картину биоразнообразия растений Армении, а также восстановить список многих ранее возделываемых ценных растений ныне незаслуженно забытых.

Наличие указателей грибов, субстратов, болезней позволяет проследить за изменчивостью отдельных видов в разных экологических средах и более полноценно охарактеризовать их эколого-морфологические и физиологические особенности.

Рациональность конструкции “Библиографии”, а также наличие предметных указателей позволяют пользователям различной специальной подготовки успешно использовать данный труд.

Предложенная читателю “Библиография” является редким экземпляром результата десятилетий кропотливого труда и большим усилием по охвату в единое целое широчайшего материала самых разных аспектов исследования грибов. Неоспоримы высокие заслуги авторов “Библиографии”, во главе с ее инициатором и руководителем столь многотрудной и целемной работы, Лии Леоновны Осипян. Несомненно, зафиксированная ими база послужит дальнейшему успешному развитию микологических исследований в Армении.