



ISSN 0366-5119

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF ARMENIA

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
BIOLOGICAL JOURNAL OF ARMENIA

2016

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

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

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

ԽՄԲԱԳՐԱԿԱՆ ԿՈԼԵԳԻԱ

Է.Ս.Գևորգյան (*գլխավոր խմբագիր*), Ռ.Մ.Հարությունյան (*գլխավոր խմբագրի տեղակալ*), Ա.Հ. Եսայան (*պատասխանատու քարտուղար*), Գ.Գ. Գևորգյան, Ա.Հ. Թոչումյան, Լ.Ռ. Մանվելյան, Ս.Խ. Մայրապետյան, Ժ.Հ. Վարդանյան.

ԽՄԲԱԳՐԱԿԱՆ ԽՈՐՀՈՒՐԴ

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Յ.Ս. Գևորգյան (*главный редактор*), Ր.Մ. Արությունյան (*заместитель главного редактора*), Ա.Գ. Եսаян (*ответственный секретарь*), Գ. Գ. Գևորգյան, Ա.Ա. Թրչունյան, Լ.Ր. Մանվելյան, Ս.Մ. Մայրապետյան, Ջ.Ա. Վարդանյան

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Յու.Տ. Ալեքսանյան, Յ.Գ. Աֆրիկյան, Մ.Ա. Դավթյան, Ջ.Ի. Ակոբյան, Վ.Ս. Ակոբյան, Ս.Օ. Մովսեսյան, Կ.Ս. Սոցոսյան, Գ.Ա. Սոսոսյան, Լ.Լ. Օսիպյան

THE EDITORIAL BOARD

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

THE EDITORIAL COUNCIL

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

ԲՈՎԱՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆ
•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ•

Ստեփանյան Ս.Խ., Վարդանյան Ա.Կ., Վարդանյան Ն.Ս. Պիրիտի, սուլֆիդային հանքաքարի և պղնձի խտանյութի կենսաօքսիդացումը նոր մեկուսացված ծծումբ և/ կամ երկաթ օքսիդացնող բակտերիաների միջոցով.....	6
Խաչիկյան Թ.Գ., Մամյան Ա.Ս., Համբարյան Լ.Ռ. Արգիճի գետի ֆիտոպլանկտոնային համակեցության տեսակային կազմի փոփոխման առանձնահատկությունները.....	11
Գևորգյան Է.Ս., Յավրոյան Ժ.Վ., Հակոբյան Ն.Ռ., Հովհաննիսյան Ա.Գ., Մարգարյան Է.Գ. Առնետի լյարդի կորիզային մատրիքսի սֆինգոմիելինի և ֆոսֆատիդիլիտիլինի բաղադրության փոփոխությունը ցիտպլազմային <i>in vivo</i> ազդեցության դեպքում.....	16
Կարապետյան Ա.Ս. Սննդալուծության խտության ազդեցությունը <i>Callisia fragrans</i> դեղաբույսի արդյունավետության վրա անհող մշակույթի պայմաններում.....	20
Մուխանյան Ժ.Հ., Պողոսյան Գ.Հ., Վարդանյան Պ.Հ. Ծայրահեղ բարձր հաճախականության ԷՄՃ ազդեցությունը ցորենի ծիլերում լիպիդների պերօքսիդային օքսիդացման և հակաօքսիդանտային ֆերմենտների ակտիվության վրա.....	24
Ավայան Ռ.Է., Աղաջանյան Է.Ա., Աթոյանց Ա.Լ., Գևորգյան Ա.Լ., Միմոնյան Ա.Է. Հայաստանի Սյունիքի մարզի հողերի կենսաթեստավորման գնահատականը մոդելային թեստ-օբյեկտ տրադեսկանցիայի 02 կլոնի կիրառմամբ հող-բույս համակարգում.....	30
Մայրապետյան Ս.Խ., Թադևոսյան Ա.Հ., Ասատրյան Ա.Զ. Ճապոնական ռեհանի աճեցման հնարավորությունը օրգանական հիդրոպոնիկայի պայմաններում.....	35
Ազարյան Կ.Գ., Բադալյան Ռ.Ս., Թադևոսյան Լ.Ս. Միկոնետ միկորիզային պատրաստու- կի օգտագործումը որպես դոմի տարբեր տեսակների աճման խթանիչ.....	41
Բադալյան Վ.Վ., Մարգարյան Ա.Ա., Հարությունյան Վ.Վ. Միկրոալիքային եղանակով նատրիումի և կալիումի սիլիկատների սինթեզ տիեզերական ապարատների ջերմակարգավորիչ թաղանթների համար.....	45
Միմոնյան Ռ.Ս., Ֆեսչյան Ս.Ս., Միմոնյան Գ.Ս., Օքսուգյան Գ.Ռ., Միմոնյան Ս.Ա. Իշխան ձկան ձկնկիթից, կովի կաթից և հավի ձվի դեղնուցից ՆԱԴՊH օքսիդազի ֆրակցիայի անջատումը և հատկությունները.....	50
Մալաթյան Ս.Հ., Բաջինյան Ս.Ա., Եղիազարյան Դ.Է. Լ-Թիրոզինի և պիրիդին-կարբօքսալ- դեհիդրների ածանցյալ շիֆֆի հիմքերի հետ պղնձի կոմպլեքսների հետազոտությունը որպես պոտենցիալ ռադիոպաշտպանիչ ագենտներ.....	55
Հարությունյան Ա.Ա., Սուկասյան Ռ.Ս., Գրիգորյան Ա.Ս. Որոշ նոր տեղակալված պիրիմիդին- ների և կոնդենսացված ազահետերոցիկլների ՄԱՕ – արգելակող հատկությունները.....	60
Ավագյան Բ.Ա. Բնափայտ քայքայող սնկերի մշակույթների աճի պայմանների փոփոխումը ՄՄ-ալիքներով.....	64
Ղուչիկյան Վ.Տ., Մանուկյան Լ.Ս., Ծատուրյան Ա.Հ., Մաղյան Ա.Ս., Ղուչիկյան Ա.Տ., Հովհաննիսյան Լ.Է., Հովսեփյան Հ.Յ., Բաբախանյան Ս.Ս. Հայաստանի հանրապետությունում և Լեռնային Ղարաբաղում աճեցված ստեփա բույսի (<i>Stevia Rebaudiana</i> Bertoni) տերևներից քաղցր գլիկոզիդների անջատման արդյունավետ եղանակի մշակումը.....	70
Պիպոյան Ս.Խ., Առաքելյան Ա.Ս., Գալստյան Լ.Գ., Գաբայան Բ.Ս. Աղստև և հախում գետերի փոքր հիդրոէլեկտրակայանների ձկնուղիները և դրանց նշանակությունը ձկնաշխարհի պահպանության համար.....	75
Բադալյան Բ.Ա., Հարությունյան Ս.Վ. Հիպօքսիայի ազդեցությունն առնետների գլխուղեղի սպիտակուցների ամիդացման վրա ծերացման ժամանակ.....	79
Կարապետյան Մ.Ա., Արամյան Ն.Յու. Օրգանիզմի ինտեգրատիվ դաշտի փոփոխությունը թթվածնաքաղցի պայմաններում.....	84
□ Համառոտ հաղորդումներ □	
Մարգարյան Ն.Հ., Առաքելյան Ս.Ս., Դանիելյան Ֆ.Դ. Հայաստանի ջրային լորտու <i>Natrix tessellata</i> (LAURENTI, 1768) հելմինթային վարակվածությունը.....	89
Արմեն Համբարձումի Թռչունյան (60-ամյա հոբելյանի առթիվ).....	92

СОДЕРЖАНИЕ

•Экспериментальные и теоретические статьи•

Степанян С.Х., Варданян А.К., Варданян Н.С. Окисление пирита, сульфидной руды и концентрата меди выделенными серо- и железooksисляющими бактериями.....	6
Хачикян Т.Г., Мамян А.С., Гамбарян Л.Р. Особенности изменения видового состава фитопланктонного сообщества реки Аргичи.....	11
Геворкян Э.С., Явоян Ж.В., Акопян Н.Р., Оганесян А., Саргсян Э.Г. Изменения содержания сфинголипида и фосфатидилхолина в препаратах ядерных мембран клеток печени крыс под воздействием цисплатина.....	16
Карапетян А.С. Влияние концентрации питательного раствора на продуктивность лекарственного растения <i>Callisia fragrans</i> в условиях беспочвенной культуры.....	20
Мухаелян Ж.А., Погосян Г.А., Вардеванян П.О. Влияние ЭМИ КВЧ-диапазона на перекисное окисление липидов и активность антиоксидантных ферментов в проростках пшеницы.....	24
Авалян Р.Э., Агаджанян Э.А., Атоянц А.Л., Геворкян А.Л., Симонян А.Э. Биотестирование почв Сюникского марза Армении с применением модельного тест объекта клон 02 традесканции в системе почва-растение.....	30
Майрапетян С.Х., Тадевосян А.О., Асатрян А.З. Возможность выращивания японского базилика в условиях органической гидропоники.....	35
Азарян К.Г., Балаян Р.С., Тадевосян Л.М. Использование микоризного препарата миконет как стимулятора роста для разных видов тыквы.....	41
Баграмян В.В., Саргсян А.А., Арутюнян В.В. Синтез силикатов натрия и калия для терморегулирующих покрытий космических аппаратов микроволновым методом.....	45
Симонян Р.М., Фесчан С.М., Симонян Г.М., Оксюзян Г.Р., Симонян М.А. Выделение и свойства фракции NADPH оксидазы из икры ручьевой форели, коровьего молока и желтка куриного яйца.....	50
Малакян М.Г., Баджигян С.А., Егиазарян Д.Э. Изучение комплексов меди с основаниями шиффа, производными l-тирозина и пиридинкарбоксальдегидов, в качестве потенциальных радиозащитных агентов.....	55
Арутюнян А.А., Сукасян Р.С., Григорян А.С. МАО-ингибирующие свойства некоторых новых замещенных пиримидинов и конденсированных азагетероциклов.....	60
Авагян И.А. Модификация условий роста культур дереворазрушающих грибов ММ-волнами.....	64
Кочикян В.Т., Манукян Л.С., Цатурян А.О., Сагиян А.С., Кочикян А.Т., Оганесян Л.Э., Овсепян Г.Ю., Бабаханян М.А. Разработка эффективного способа выделения сладких гликозидов из листьев стевии (<i>Stevia Rebaudiana bertonii</i>), выращенной в Армении и Нагорном Карабахе.....	70
Пипоян С.Х., Аракелян А.С., Галстян Л.Г., Габаян И.С. Рыбопропускные сооружения малых гидроэлектростанций на реках Агстев и Ахум и их значение для охраны ихтиофауны.....	75
Бадалян И.А., Арутюнян С.В. Влияние гипоксии на амидированность белков головного мозга крыс при старении.....	79
Карапетян М.А., Адамян Н.Ю. Изменение интегративного сигнала организма в условиях кислородной недостаточности.....	84
□ Краткие сообщения □	
Саргсян Н.О., Аракелян М.С., Даниелян Ф.Д. Заражение гельминтами водяных <i>Natrix tessellata</i> (Laurenti, 1768) ужей Армении.....	89
Трчунян Армен Амбарцумович (к 60-летию со дня рождения).....	92

CONTENTS

•Experimental and theoretical articles•

<i>Stepanyan S.Kh., Vardanyan, A.K., Vardanyan N.S.</i> Biooxidation of pyrite, sulfideore and copper concentrate by new isolated sulfur and/or iron oxidizing bacteria.....	6
<i>Khachikyan T.G., Mamyan A.S., Hambaryan L.R.</i> Peculiarities of alterations in the phytoplankton species composition of Argichi river.....	11
<i>Gevorgyan E.S., Yavroyan Zh.V., Hakobyan N.R., Hovhannisyan A.G., Sargsyan E.G.</i> Changes in sphingomyelin and phosphatidylcholine content in rat liver nuclear structures during the <i>in vivo</i> action of cisplatin.....	16
<i>Karapetyan A.S.</i> Influence of nutrient solution concentration on the productivity of herb <i>Callisia frangrans</i> in soilless culture conditions.....	20
<i>Mukhaelyan Zh.H., Poghosyan G.H., Vardevanyan P.H.</i> Effect of extremely high frequency emi on lipid peroxidation and activeties of antioxidant enzymes of wheat shoots.....	24
<i>Avalyan R.E., Aghajanyan E.A., Atoyants A.L., Gevorgyan A.L., Simonyan A.E.</i> Biotesting of soils in Syunik Marz of Armenia with application of model test-object of the clone 02 tradescantia in the soil-plant system.....	30
<i>Mairapetyan S.Kh., Tadevosyan A.H., Asatryan A.Z.</i> Growth possibility of japanese basil in organic hydroponics.....	35
<i>Azaryan K.G., Balayan R.S., Tadevosyan L.M.</i> Using the mycorrhizal preparation mykonet as the growth stimulator of various kinds of pumpkin.....	41
<i>Baghranyan V.V., Sargsyan A.A., Harutyunyan V.V.</i> Synthesis sodium, potassium silicates for thermoregulating coatings space vehicles by microwave method.....	45
<i>Simonyan R.M., Feschyan S.M., Simonyan G.M., Oxuzyan G.R., Simonyan M.A.</i> Isolation and properties of the fraction of NADPH oxydase from Forel fish caviar, hens egg yolk and cow milk.....	50
<i>Malakyan M.M., Bajinyan S.A., Yeghiazaryan D.E.</i> Study of L-tyrosine and pyridinecarboxaldehydes derived schiff base copper complexes as potential radioprotective agents.....	55
<i>Harutyunyan A.A., Sukasyan R.S., Grigoryan A.S.</i> MAO – Inhibiting properties of some new substituted pyrimidines and condensed azaheterocycles.....	60
<i>Avagyan I.A.</i> Modification of growth conditions by mm-waves of wood-decaying mushroom's cultures.....	64
<i>Ghochikyan V.T., Manukyan L.S., Tsaturyan A.O., Saghyan A.S., Ghochikyan A.T., Hovhannisyan L.E., Hovsepyan G.U., Babakhanyan M.A.</i> Development of the efficient method for isolation of sweet glycosides from stevia (<i>Stevia RebaudianA</i> Bertoni) leaves grown in Republic of Armenia and Nagorno-Karabakh.....	70
<i>Pipoyan S.Kh., Arakelyan, A.S., L.G. Galstyan, Gabayan I.S.</i> Fish ladders of small hydropower plants and their importance for protection of fish stocks in the rivers of Aghstev and Hakhum Rivers	75
<i>Badalyan I.A., Harutyunyan S.V.</i> The effect of hypoxia on the protein amidation of group in rat brain at aging.....	79
<i>Karapetyan M.A., Adamyan N.J.</i> The change in integrative signal of organism at oxygen deficiency conditions.....	84

□ Short communications □

<i>Sargsyan N.H., Arakelyan M.S., Danielyan F.D.</i> Infestation of dice snake <i>Natrix tessellata</i> (Laurenti, 1768) by helminths in Armenia.....	89
<i>Armen Hambartzumi Trchounian</i> (in the honor of the 60 th anniversary)	92



Biolog. Journal of Armenia, 1 (68), 2016

BIOOXIDATION OF PYRITE, SULFIDE ORE AND COPPER CONCENTRATE BY NEW ISOLATED SULFUR AND/OR IRON OXIDIZING BACTERIA

S. KH. STEPANYAN, A.K. VARDANYAN, N.S. VARDANYAN

SPC "Armbiotechnology" of NAS RA
stepanyansk@gmail.com, nvard@sci.am

New original strains of iron oxidizing bacteria were isolated from natural biotopes and experimental systems of bioleaching. The highest activity in pyrite oxidation among isolated strains showed *Acidithiobacillus* sp. 13Zn, isolated from bioleaching pulp of zinc concentrate. *Acidithiobacillus* sp. 13 Zn also demonstrated considerable activity in oxidation of Drmbon gold bearing ore and copper concentrate. Growth of the strain on ferrous iron is possible in the range of pH 1.4-2.6 with optimal pH 2.0, optimal temperature for growth is 37°C. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences the isolates Tz and Dr were identified as *Acidithiobacillus ferrooxidans*, strain 13Zn can be represented as a new species of the genus *Acidithiobacillus*.

Iron oxidizing bacteria – bioleaching of pyrite – gold-bearing ore – copper concentrate

Բնական բիոտոպերից և տարրալուծման փորձարարական համակարգերից մեկուսացվել են երկաթ օքսիդացնող բակտերիաների նոր օրիգինալ շտամներ: Շտամներից պիրիտի օքսիդացման առավելագույն ակտիվություն ցուցաբերել է ցինկի խտանյութի կենսատարրալուծման պուլպից մեկուսացված *Acidithiobacillus* sp. 13Zn շտամը: Շտամը ցուցաբերել է նաև պղնձի խտանյութի և ոսկեբեր պղնձային հանքաքարի տարրալուծման բավարար ակտիվություն: Շտամի աճի օպտիմալ ջերմաստիճանը 37°C է, pH-ը 2,0 է, աճը երկարժեք երկաթի վրա հնարավոր է pH 1.4-2.6 միջակայքում: 16 S ռԲՆԹ ի հաջորդականության ֆիլոգենետիկ վերլուծության հիման վրա մեկուսացված Tz և Dr շտամները նույնականացվել են որպես *Acidithiobacillus ferrooxidans*, իսկ *Acidithiobacillus* sp. 13Zn-ը կարող է ներկայացվել որպես *Acidithiobacillus* ջեդի նոր տեսակ:

*Երկաթ օքսիդացնող բակտերիաներ – պիրիտի տարրալուծում –
ոսկեբեր հանքաքար – պղնձի խտանյութ*

Новые оригинальные штаммы железooksисляющих бактерий были изолированы из природных биотопов и экспериментальных систем биовыщелачивания. Наивысшую активность в окислении пирита проявлял *Acidithiobacillus* sp. 13Zn, изолированный из пульпы выщелачивания цинкового концентрата. *Acidithiobacillus* sp. 13Zn также показал значительную активность в окислении Дрмбонской золотоносной руды и медного концентрата. Рост штамма в присутствии двухвалентного железа возможен в пределах pH 1.4-2.6 с оптимальным значением pH 2.0, оптимальной температуре роста 37°C. На основании филогенетического анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК выделенные штаммы Tz и Dr были идентифицированы как *Acidithiobacillus ferrooxidans*, штамм 13Zn может быть представлен как новый вид рода *Acidithiobacillus*.

Железooksисляющие бактерии – выщелачивание пирита –

Bioleaching is an alternative resource saving and environmentally friendly method for metal recovery from ores and concentrates [3]. It is based on the abilities of acidophilic bacteria and archaea to oxidize sulfide minerals.

Previously, bioleaching of metals was more often associated with mesophilic bacteria from genus *Thiobacillus* (now *Acidithiobacillus*): *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. Later on, studies have shown that *Leptospirillum* and other thermophilic and thermotolerant bacteria are dominating in bioleaching niches [2, 4, 7-9]. The exceptional diversity of eco-geographical conditions of Armenia and the richness of metal ores provide great possibilities to isolate and study iron oxidizing bacteria perspective for metal biotechnology.

In this paper we have carried out investigations for studying communities of chemolithotrophic bacteria in different natural ecosystems and technological conditions, as well as revealing physiological peculiarities of isolated original and active strains. The potential of isolated original and active strains and their communities for the application in bioleaching of pyrite, gold-bearing ore and copper concentrate has been evaluated.

Materials and methods. Strains of iron oxidizing chemolithotrophic bacteria (Tz, Dr, CC, 15 and 13Zn) were isolated from natural and technogenic biotopes (acid drainage water, ore dumps) of Tandzut polymetallic, and Drmbon copper gold-bearing ores of Armenia as well as from experimental systems of bioleaching. To isolate iron oxidizing bacteria, Mackintosh medium [5] with ferrous iron as a source of energy was inoculated with acid mine drainage water, ore dump or bioleaching pulp samples and incubated at 30, 37 and 45°C for 7-10 days.

Pure cultures were obtained by transferring the yellow and yellow-brown colonies growing on Manning [6] and FeTSB₀ [4] solid media to the above mentioned liquid medium. Isolation, cultivation and characterization of iron oxidizing strains were performed in our previous work [10].

DNA extraction, PCR of 16S rRNA, phylogenetic analysis. DNA extraction was carried out according to the method described by [1].

PCR amplification was performed in 25 µl reaction mixture which contained 10 µg of the genome DNA, 5 µl buffer (GoTaq®Flexi DNA Polymerase M8291), 2 mM MgCl₂, 100-200 µM dNTPs, 10 pmol of each primers (27F-AgA gTT TgA TCM TGG CTC Ag and 1492R-TAC ggY TAC CTT gTT Acg ACT T), 1 unite taq-polymerase (PROMEGA®), nuclease-free water.

Extraction and purification of PCR-product from agarose gel were done using Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (ZYMO RESEARCH). The purified PCR products of approximately 1,400 bp were sent to Korea (MACROGEN) for sequencing. Sequencing was performed using Big Dye terminator cycle sequencing kit (Applied BioSystems, USA).

The 16S rRNA gene nucleotide sequences of isolated strains were analyzed using BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Construction of phylogenetic trees was done by MEGA 6.06 software using neighbor-joining method. Bootstrap analysis was carried out on 1000 replicate input data sets.

Bioleaching of pyrite: The bacterial strains were grown on Mackintosh medium containing Fe(II) as an energy source [5]. In the logarithmic phase of growth the cells were collected by centrifugation at 6000 g for 10 min, washed with acidified Mackintosh medium and resuspended in the same medium without iron. Pyrite (FeS₂) from Shamlugh ore, copper concentrate (Armenia) and Drmbon gold-bearing ore (Nagorno Karabakh) ground to 45-63 µm were placed into 250 ml Erlenmeyer flasks and sterilized. Then 50 ml of Mackintosh medium without Fe(II), pH 2.0 adjusted by H₂SO₄ and washed bacterial suspension (10⁸ cells/ml) were added to the flasks. The bioleaching experiments were carried out at 37°C in shaking conditions (180 revs/min). The pulp density was calculated as pyrite or sulfide ore ratio to the volume of the medium. Sampling was performed at 24 h intervals and pH, ferric Fe(III) and ferrous (Fe(II)) ions in the medium were analyzed. Concentration of copper and total iron were determined by atomic absorption spectrometer AAS 1N (Germany).

Results and Discussion. Original strains of iron oxidizing chemolithotrophic bacteria (CB) were isolated from natural biotopes of polymetallic (Tandzut) and copper gold-bearing (Drmbon) ores in Armenia and from experimental systems of bioleaching

and studied. At first screening of isolated strains in respect of pyrite oxidation was performed. The strains were tested for oxidation of pyrite (FeS_2) from Shamlugh ore (Armenia).

Comparative activities of isolated cultures of iron oxidizing bacteria in pyrite oxidation (Shamlugh, Armenia) are presented in fig. 1. As seen from the fig. 1, *Acidithiobacillus* sp. Tz and *Leptospirillum* sp. CC showed similar activities in pyrite oxidation. Efficiency of *Acidithiobacillus* sp. Dr and *Acidithiobacillus* sp. 15 was inferior to its above mentioned strains. The highest activity in pyrite oxidation showed *Acidithiobacillus* sp. 13Zn. Pyrite oxidation activity of *Acidithiobacillus* sp. 13Zn exceeded that of *Acidithiobacillus* sp. Tz and *Leptospirillum* sp. CC about 2.1-2.3 and 2.4-3.0 times respectively (fig.1).

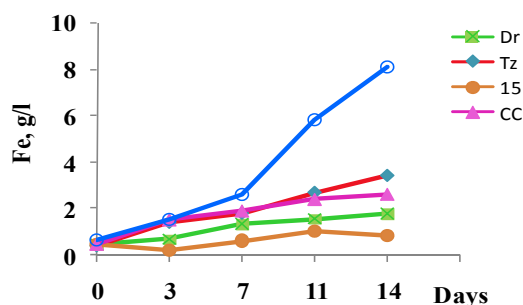


Fig.1. Bioleaching of pyrite by isolated iron oxidizing bacteria *Acidithiobacillus* sp. Tz, Dr, 15, 13Zn and *Leptospirillum* sp. CC (PD- 4%, t 30°C, pH 2)

Thus, further investigations were carried out with *Acidithiobacillus* sp. 13Zn. The main physiological properties of the mentioned strain were revealed. Optimal temperature for growth was 37°C. Growth of the strain on ferrous iron is possible in the range of pH 1.4-2.6 with optimal pH 2.0 (fig.2).

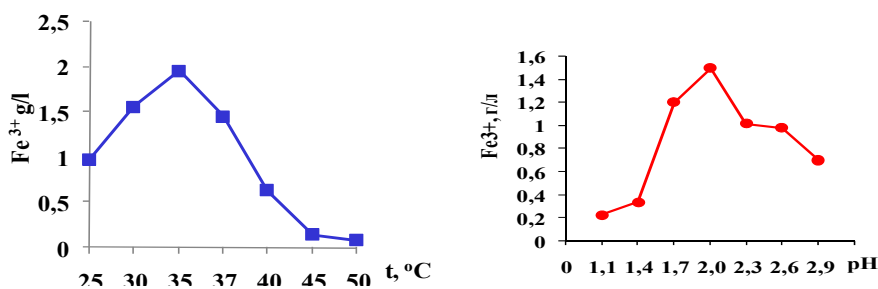


Fig 2. Influence of temperature (a) and pH (b) on oxidation of iron by *Acidithiobacillus* sp. 13Zn

16S rRNA gene sequences analysis. The 16S rRNA genes of isolated strains were amplified and the PCR amplification product was detected by 1.0% agarose gel electrophoresis. Preliminary analysis of 16S rRNA gene nucleotide sequences of strains was done using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Construction of phylogenetic trees was done by MEGA 6.06.

According to dendrogram presented in fig. 3, Isolate 13Zn was clustered into *At.ferrooxidans* and possessed 91% sequence similarity with the type strain *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Thus, according to phylogenetic analysis based on 16S rRNA sequences, the strain 13Zn can be presented as a new species of the genus *Acidithiobacillus*.

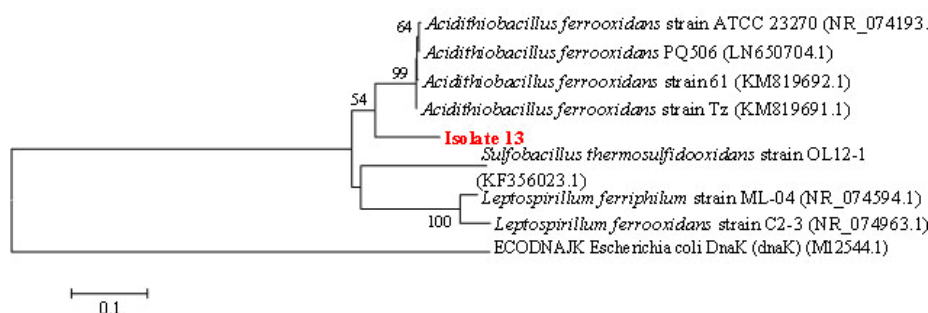


Fig. 3. Phylogenetic tree of isolated strain *Acidithiobacillus* sp. 13Zn. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6.

Isolated strains Dr, and Tz were clustered into *At.ferrooxidans* and possessed 99% sequence similarity with the type strain *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 and were identified as *At.ferrooxidans* [10].

Isolated bacteria were deposited in the Microbial Depository Center of the SPC of “Armbiotechnology” of NAS of Armenia and got the MDC numbers (Dr-MDC 7042, Tz-MDC 7043, CC-MDC 7047, 13Zn –MDC 7054).

Bioleaching of gold bearing ores and copper concentrates. *Acidithiobacillus* sp. 13Zn was also tested in respect of Drmbon gold- bearing ore (Nagorno Karabakh). As shown in fig. 4, *Acidithiobacillus* sp. 13Zn accelerates oxidation of the mentioned sulfide ore approximately 5.3 times in comparison with uninoculated control (chemical oxidation).

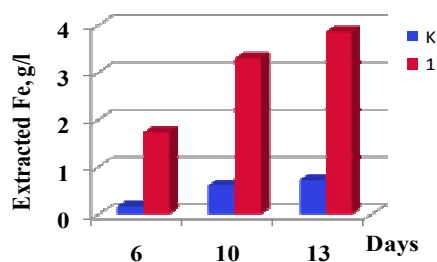


Fig. 4. Bioleaching of iron from Drmbon concentrate by *Acidithiobacillus* sp. 13Zn (PD 10%, t-37°C)

Biooxidation of copper concentrate by *Acidithiobacillus* sp. 13Zn is presented in fig.5. Data obtained indicated that extraction of copper and iron from copper concentrate by *Acidithiobacillus* sp. 13Zn increased about 7-8 and 3 times respectively (fig. 5).

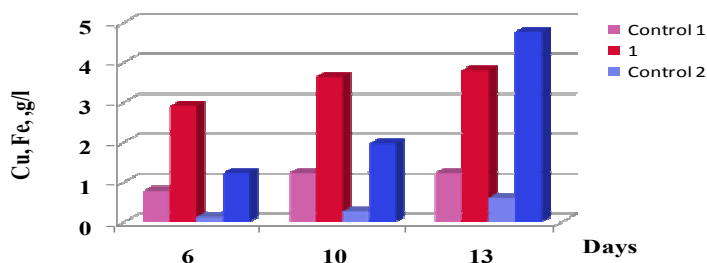


Fig. 5. Bioleaching of iron (1) and copper (2) from copper concentrate by *Acidithiobacillus* sp. 13Zn (PD 10%, t-37°C)

Thus, we can conclude that new isolated strain *Acidithiobacillus* sp. 13Zn may serve as an efficient candidate for development and performing high efficient bio-oxidation process of pyrite-containing ores especially gold bearing ores as well as copper concentrates.

REFERENCES

1. Aljanabi S. M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acid Research*, 25, p. 4692-4693, 1997.
2. Coram, N.J., Rawlings, D.E. Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. dominates South African commercial biooxidation tanks that operate at 40°C. *Applied and environmental microbiology*, 68, 2, 838-845, 2002.
3. Johnson, D.B. Biomining—biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials. *Current opinion in biotechnology*, 30, 24-31, 2014.
4. Johnson, D.B., Okibe, N., Hallberg, K.B. Differentiation and identification of iron-oxidizing acidophilic bacteria using cultivation techniques and amplified ribosomal DNA restriction enzyme analysis. *Journal of microbiological methods*, 60, 3, 299-313, 2005.
5. Mackintosh M.E. Nitrogen Fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of General Microbiology*, 105, 215-218, 1978.
6. Manning H.L. New medium for isolating iron-oxidizing and heterotrophic acidophilic bacteria from acid mine drainage. *Appl. Microbiol.*, 30, 6, 1010, 1975.
7. Okibe, N., Gericke, M., Hallberg, K.B., Johnson, D.B. Enumeration and characterization of acidophilic microorganisms isolated from a pilot plant stirred-tank bioleaching operation. *Applied and environmental microbiology*, 69, 4, 1936-1943, 2003.
8. Sand, W., Rohde, K., Sobotke, B., Zenneck, C. Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for leaching. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1, 85-92, 1992.
9. Vardanyan, N., Akopyan, V. *Leptospirillum*-like bacteria and evaluation of their role in pyrite oxidation. *Microbiology*, 72, 4, 438-442, 2003.
10. Vardanyan A., Stepanyan S., Vardanyan N., Markosyan L., Sand W., Vera V., Zhang R. Study and assessment of microbial communities in natural and commercial bioleaching systems, *Minerals Engineering*, 81, p. 167-172, 2015.

Received on 25.12.2015



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1(68), 2016

ԱՐԳԻՃԻ ԳԵՏԻ ՖԻՏՈՂԼԱՆԿՏՈՆԱՅԻՆ ՀԱՄԱԿԵՑՈՒԹՅԱՆ ՏԵՍԱԿԱՅԻՆ ԿԱԶՄԻ ՓՈՓՈԽՄԱՆ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Թ.Գ. ԽԱՉԻԿՅԱՆ, Ա.Ս. ՄԱՍՅԱՆ, Լ.Ռ. ՀԱՄԲԱՐՅԱՆ

*ՀՀ ԳԱԱ Կենդանաբանության և հիդրոէկոլոգիայի Գիտական կենտրոնի
Հիդրոէկոլոգիայի և ձկնաբանության ինստիտուտ
tkhachikyan@mail.ru*

2015թ. կատարվել է Արգիճի գետի ֆիտոպլանկտոնային համակեցության հետազոտություն: Բացահայտվել են համակեցության գերակա տեսակները, ուսումնասիրվել են տեսակային կազմի փոփոխման օրինաչափությունները: Պարզվել է, որ համակեցությունում տարածական և ժամանակային առումով դիտվել է տեսակային կազմի մեծ նմանություն, ինչը կարող է վկայել Արգիճի գետի համեմատաբար կայուն էկոլոգիական պայմանների մասին: Համակեցության տեսա-կային կազմի ձևավորման մեջ զգալի ազդեցություն է ունեցել հոսքի արագությունը:

Ֆիտոպլանկտոնային համակեցություն – գերակայող տեսակներ – հոսքի արագություն

В 2015 г. было исследовано фитопланктонное сообщество р. Аргичи. Выявлены доминантные виды сообщества, изучены закономерности изменения видового состава. Выяснилось, что с точки зрения пространственно-временного развития фитопланктона наблюдается большая степень сходства видового состава, что может свидетельствовать о сравнительно стабильных экологических условиях реки. Показано, что в формировании видового состава фитопланктона большое влияние имеет скорость течения.

Фитопланктонное сообщество – доминантные виды – скорость течения

The phytoplankton community of Argichi River was studied in 2015. The dominant species and changes of species composition of phytoplankton community were revealed.

The large degree of similarity of species composition was registered in terms of space-time development of phytoplankton community of Argichi River, which may indicate the relatively stable ecological conditions of the river. It was revealed that the flow velocity has considerable effect on the formation of phytoplankton species composition.

Phytoplankton community – dominant species – flow velocity

Ջրային էկոհամակարգերի հետազոտություններում կարևոր նշանակություն ունեն համակեցություններում ջրիմուռների տեսակային կազմի ձևավորման, պահպանման և փոփոխման գործընթացների ուսումնասիրությունները [13, 14]:

Ֆիտոպլանկտոնի տեսակային կազմը զգալուն կենսաբանական ցուցիչ է, որն արձագանքում է ջրային էկոհամակարգերում կենսապայմանների տարաբնույթ փոփոխություններին, այն արտահայտվում է պլանկտոնային ջրիմուռների տեսակային կազմի և քանակական ցուցանիշների փոփոխությամբ: Ջրային էկոհամակարգերում համակեցության տեսակային կազմի փոփոխություններ են դիտվում ինչպես սեզոնային ֆլուկտուացիաների ժամանակ, այնպես էլ՝ մարդածին աղտոտվածության պայմաններում:

Ուսումնասիրության օբյեկտ է ընտրվել Արգիճի գետը, Սևանա լճի ջրհավաք ավազանի ամենաջրառատը, որի երկարությունը 51 կմ է, իսկ ջրհավաք ավազանի մակերեսը՝ 384 կմ² [1]: Արգիճին աչքի է ընկնում պլանկտոնային ջրիմուռների տեսակային մեծ բազմազանությամբ [2]:

Աշխատանքի նպատակն է հանդիսացել Արգիճի գետում ֆիտոպլանկտոնային համակեցության տեսակային կազմի տարածամասնակային առանձնահատկությունների ուսումնասիրությունները և դոմինանտ կոմպլեքսի բացահայտումը:

Նյութ և մեթոդ: Աշխատանքի համար նյութ են ծառայել 2015թ. գարնանը և աշնանը Արգիճի գետի վերին, միջին և ստորին հոսանքներից վերցված փորձանմուշները:

Փորձանմուշների նախնական և հետագա լաբորատոր մշակումները կատարվել են ջրակենսաբանությունում ընդունված մեթոդներով [3]: Ուսումնասիրվել է ֆիտոպլանկտոնային համակեցության որակական և քանակական կազմը: Ջրիմուռների տեսակային կազմի որոշումը կատարվել է տեսակների որոշման համընդհանուր ճանաչում գտած որոշիչների և ուղեցույցների օգնությամբ [8, 9, 12, 16]: Տեսակային կազմի նմանությունը գնահատվել է ըստ Մորենսենի ցուցիչի [15]:

Արդյունքներ և քննարկում: Գարնանը Արգիճի գետի ֆիտոպլանկտոնային համակեցության հետազոտության արդյունքում արձանագրվել է պլանկտոնային ջրիմուռների 26 ցեղի 54 տեսակ: Գերակայել են դիատոմային ջրիմուռները՝ 47 տեսակ: Արձանագրվել է կապտականաչ ջրիմուռներից 6, իսկ էվգլենայիններից՝ 1 տեսակ: Համեմատաբար լայն տեսակային բազմազանությամբ աչքի են ընկել *Cymbella* (7), *Navicula* (6), *Nitzschia* (5), *Pinnularia* (5), *Gomphonema* (4) և *Fragilaria* (3) ցեղերը, որոնց զգալի մասը, ըստ կենսաձևի, բենթոսային և պլանկտոնաբենթոսային տեսակներ են [4]: Վերջիններիս առկայությունը պլանկտոնում հավանաբար պայմանավորված է գետի ջրաբանական ռեժիմով՝ մասնավորապես հոսքի բարձր արագությամբ: Երկուական տեսակ է արձանագրվել *Diatoma*, *Achnanthes*, *Cyclotella*, *Surirella* և *Oscillatoria*, մեկական տեսակ՝ *Ceratoneis*, *Amphora*, *Meridion*, *Cocconeis*, *Stephanodiscus*, *Rhoicosphenia*, *Hantzschia*, *Melosira*, *Stauroneis*, *Aphanothece*, *Microcystis*, *Spirulina*, *Gleocapsa*, *Phormidium* և *Trachelomonas* ցեղերում:

Ուսումնասիրությունների ընթացքում գետի վերին հոսանքում գրանցվել է պլանկտոնային ջրիմուռների 44 տեսակ, որոնցից 40-ը՝ դիատոմային, 4-ը՝ կապտականաչ (աղ. 1): Ֆիտոպլանկտոնի ընդհանուր թվաքանակը կազմել է 2 430 000 բջ/լ, իսկ կենսազանգվածը՝ 11.8 գ/մ³: Քանակական ցուցանիշների զգալի մասնաբաժինը պատկանել է դիատոմային ջրիմուռներին (97%՝ ըստ թվաքանակի և 98%՝ ըստ կենսազանգվածի): Մոնոդոմինանտ է հանդիսացել դիատոմային ջրիմուռներից *Ceratoneis arcus* բենթոսային տեսակը (51%՝ ըստ թվաքանակի և 41%՝ ըստ կենսազանգվածի), որը բնորոշ է սառը և հոսող ջրերին [4, 5]: Զգալի քանակական զարգացում են ունեցել նաև *Fragilaria construens*, *Meridion circulare* և *Cymbella ventricosa* տեսակները:

Աղյուսակ 1. Արգիճի գետի ֆիտոպլանկտոնային համակեցության դասակարգումն ըստ սեզոնների

Ջրիմուռների բաժիններ	Գարուն			Աշուն		
	1*	2*	3*	1	2	3
Bacillariophyta	40	30	37	23	33	31
Cyanophyta	4	5	3	3	3	2
Chlorophyta	-	-	-	-	-	3
Euglenophyta	-	-	1	1	1	1
Ընդհանուրը	44	35	41	27	37	37

* - 1-վերին հոսանք, 2-միջին հոսանք, 3-ստորին հոսանք

Գետի միջին հոսանքում դիտվել է ֆիտոպլանկտոնի տեսակային բազմազանության (35 տեսակ) և քանակական ցուցանիշների (1 008 000 բջ/լ և 4.6 գ/մ³) զգալի անկում: Այն հավանաբար պայմանավորված է եղել ֆիտոպլանկտոնի զարգացման վրա հոսքի բարձր արագության (1.1մ/վ) ազդեցությամբ: Կրկին դոմինանտ են եղել դիատոմային ջրիմուռները (81%՝ ըստ թվաքանակի և 90%՝ ըստ կենսազանգվածի): Գերակայել են *Ceratoneis arcus* (ըստ կենսազանգվածի) և *Fragilaria construens* (ըստ թվաքանակի) տե-

ասկները, որոնց քանակական ցուցանիշները այս դիտակետում նվազել են: Նախորդ դիտակետի համեմատ դիտվել է ջերմաստիճանի որոշակի բարձրացում [աղ. 2], որի արդյունքում համակեցությունում նկատվել է կապտականաչ ջրիմուռների քանակական ցուցանիշների աճ (19%՝ ըստ թվաքանակի և 10%՝ ըստ կենսազանգվածի): Համակեցությունից դուրս են մղվել դիատոմային ջրիմուռների որոշ տեսակներ՝ *Stauroneis anceps*, *Cymbella prostrata*, *C. helvetica*, *C. lanceolata*, *Hantzschia amphioxys*, *Gomphonema parvulum* և այլն:

Աղյուսակ 2. Արգիճի գետի հոսքի արագության և ջերմաստիճանի արժեքները

Դիտակետեր*	Գարուն		Աշուն	
	Հոսքի արագություն, մ/վ	Ջերմաստիճան, °C	Հոսքի արագություն, մ/վ	Ջերմաստիճան, °C
1	0.7	11	0.2	14
2	1.1	13	0.4	14.5
3	0.3	13	0.6	14

* Դիտակետեր՝ 1-վերին հոսանք, 2-միջին հոսանք, 3-ստորին հոսանք

Արձանագրվել է ջրիմուռների 41 տեսակ, որոնցից 37-ը՝ դիատոմային, 3-ը՝ կապտականաչ և 1-ը՝ էվգլենային (աղ. 1): Ստորին հոսանքում ջերմաստիճանի փոփոխություն չի դիտվել, իսկ հոսքի արագությունը ենթարկվել է զգալի նվազման՝ 3.5 անգամ: Արձանագրվել է ֆիտոպլանկտոնի որակական և քանակական ցուցանիշների որոշակի աճ: Թվաքանակը մեծացել է 1.8, իսկ կենսազանգվածը՝ 1.9 անգամ: Քանակական ցուցանիշներով շարունակել են գերակայել դիատոմային ջրիմուռները (91%՝ ըստ թվաքանակի և 94%՝ ըստ կենսազանգվածի): Համակեցության դոմինանտներն են եղել կրկին *Ceratoneis arcus* և *Fragilaria construens* տեսակները, որոնց քանակական ցուցանիշները զգալիորեն բարձրացել են: Հոսքի ցածր արագությունը նպաստել է ֆիտոպլանկտոնային համակեցությունում որոշ պլանկտոնային և պլանկտոնաբեռն-սային տեսակների, ինչպիսիք են՝ *Stephanodiscus hantzschii*, *Cyclotella comta*, *C. kuetzingiana*, *Rhoicosphenia curvata*, *Melosira varians*, *Cymatopleura solea*, *Aphanothece clathrata*, *Microcystis aeruginosa* և *Oscillatoria geminata* քանակական ցուցանիշների բարձրացմանը:

Գարնանը Արգիճի գետի երեք դիտակետերի ֆիտոպլանկտոնի տեսակային կազմի համեմատության արդյունքում դիտվել է համակեցությունների մեծ նմանություն (աղ. 3): Տեսակային կազմի առավել մեծ նմանություն դիտվել է գետի վերին և միջին հոսանքներում (0.65): Գետի ողջ հոսանքին բնորոշ են եղել *Gomphonema olivaceum*, *G. angustatus*, *Diatoma vulgare*, *D. hiemale*, *Fragilaria construens*, *F. capucina*, *F. sp.*, *Ceratoneis arcus*, *Rhoicosphenia curvata*, *Achnanthes tainiata*, *A. minutissima*, *Melosira varians*, *Surirella robusta splendida*, *Meridion circulare*, *Cocconeis placentula*, *Cyclotella kuetzingiana*, *Cymbella ventricosa*, *Nitzschia dissipata*, *N. sp.*, *N. kuetzingiana*, *Navicula radiosa*, *Aphanothece clathrata*, *Microcystis aeruginosa*, *Spirulina sp.* և այլ տեսակներ, ինչը կարող է վկայել գետում տարածական առումով աբիոտիկ գործոնների ոչ զգալի փոփոխությունների մասին: Առանձին դիտակետերում ֆիտոպլանկտոնի տեսակային կազմի համեմատությունը ցույց է տվել, որ առավել մեծ է այն դիտակետերի նմանությունը, որտեղ հոսքի արագության արժեքներն առավել մոտ են (աղ. 2, 3):

Աղյուսակ 3. Արգիճի գետի երեք դիտակետերի ֆիտոպլանկտոնի տեսակային կազմի համեմատության արդյունքները (ըստ Սորենսենի գործակցի)

Դիտակետեր*	Սորենսենի գործակցի արժեքներ	
	Գարուն	Աշուն
1-2	0.65	0.7
1-3	0.63	0.68
2-3	0.6	0.73

* Դիտակետեր՝ 1-վերին հոսանք, 2-միջին հոսանք, 3-ստորին հոսանք

Աշնանը Արգիճի գետի ֆիտոպլանկտոնում գրանցվել է ջրիմուռների 24 ցեղերի 44 տեսակ, որոնցից 37-ը դիատոմային, 3-ը՝ կապտականաչ, 3-ը՝ կանաչ, 1-ը՝ էվգլենային: Առավել հարուստ տեսակային կազմով աչքի են ընկել *Navicula* (7), *Nitzschia* (7), *Gomphonema* (4) *Achnanthes* (3) և *Fragilaria* (3) ցեղերը: Մեկ և երկու տեսակ պարունակող ցեղերը կազմել են համակեցության տեսակային բազմազանության շուրջ 54%-ը: Գարնան համեմատ համակեցությունը համալրվել է կանաչ ջրիմուռներով, որոնց զարգացմանը հավանաբար նպաստել է ջերմաստիճանի բարձրացումը (աղ. 2):

Վերին հոսանքում արձանագրվել է ջրիմուռների 27 տեսակ: Հանդիպել են դիատոմային, կապտականաչ և էվգլենային ջրիմուռներ, գերակայել են դիատոմային ջրիմուռները (85%): Ֆիտոպլանկտոնի թվաքանակը կազմել է 404 000 բջ/լ, իսկ կենսազանգվածը՝ 1.5 գ/մ³: Ըստ թվաքանակի գերակայել են կապտականաչ ջրիմուռները (56%), ըստ կենսազանգվածի՝ դիատոմայինները (51%): Այս դիտակետում կապտականաչ ջրիմուռների զարգացմանը, հավանաբար, նպաստել է հոսքի ցածր արագությունը (աղ. 2): Համակեցությունում համեմատաբար մեծ քանակական ներդրում են ունեցել կապտականաչ ջրիմուռներից՝ *Spirulina sp.*, դիատոմայիններից՝ *Rhoicosphenia curvata*, *Gomphonema sp.* և *Cocconeis placentula* տեսակները:

Արգիճի գետի միջին հոսանքում վերին հոսանքի համեմատ դիտվել է քանակական (962 000 բջ/լ և 3.7 գ/մ³) և որակական (37 տեսակ) ցուցանիշների որոշակի աճ: Գերակայել են դիատոմային ջրիմուռները (75%՝ ըստ թվաքանակի և 83%՝ ըստ կենսազանգվածի), դոմինանտել է *Melosira varians*-ը, որը հանդիսանում է պլանկտոնաբենթոսային տեսակ [5]:

Ստորին հոսանքում գրանցվել է ջրիմուռների 37 տեսակ (աղ. 1): Ֆիտոպլանկտոնային համակեցությունը համալրվել է *Closterium ehrenbergi*, *Characium naegeli* և *Dictyosphaerium pulchellum* կանաչ ջրիմուռներով: Դիտվել է նաև քանակական ցուցանիշների կրկնակի աճ: Շարունակել են գերակայել դիատոմային ջրիմուռները՝ կազմելով թվաքանակի և կենսազանգվածի 96%-ը: Դոմինանտ տեսակ է եղել *Melosira varians*-ը, որի քանակական ցուցանիշները նախորդ դիտակետի համեմատ աճել են մոտ 7 անգամ: Բարձր քանակական ցուցանիշներով արձանագրվել են նաև *Diatoma vulgare* և *Fragilaria capucina* տեսակները:

Աշնանը գետի երեք դիտակետերում ֆիտոպլանկտոնի համեմատությունը վերհանել է տեսակային կազմի մեծ նմանություն (աղ.3): Ինչպես գարնան էր դիտվել, ֆիտոպլանկտոնի տեսակային կազմի համեմատաբար մեծ նմանություններ գրանցվել են այն դիտակետերում, որտեղ հոսքի արագության արժեքները եղել են առավել մոտ (աղ. 2, 3):

Համեմատվել է նաև գետի ֆիտոպլանկտոնային համակեցության գարնան և աշնան տեսակային կազմերը, ինչի արդյունքում դիտվել է բավականին մեծ նմանություն՝ 72%, սակայն տարբերություն է դիտվել դոմինանտ կոմպլեքսի կառուցվածքում:

Այսպիսով, Արգիճի գետի ֆիտոպլանկտոնային համակեցությունում հիմնականում գերակայում են դիատոմային ջրիմուռները, ինչը բնորոշ է լեռնային գետերի ֆիտոպլանկտոնին [6, 7, 10, 11]:

Տեսակային կազմի դոմինանտ կոմպլեքսը ձևավորվում է մեծամասամբ *Ceratoneis arcus*, *Fragilaria construens*, *F. capucina*, *Melosira varians*, *Rhoicosphenia curvata*, *Cocconeis placentula*, *Diatoma vulgare*, *Meridion circulare*, *Cymbella ventricosa* տեսակներով, ընդ որում այս բոլոր տեսակները մշտապես առկա են համակեցությունում և նրանցից որոշ տեսակների գերակայումը, հավանաբար, կրում է ֆլուկտուացիոն բնույթ, ինչը դիտվել էր նաև նախկին հետազոտությունների տարիներին [2]:

Համակեցությունում տարածական և ժամանակային առումով դիտվում է տեսակային կազմի մեծ նմանություն, ինչը կարող է վկայել աբիոտիկ գործոնների ոչ զգալի փոփոխությունների և գետի կայուն էկոլոգիական պայմանների մասին:

Տեսակային կազմի ձևավորման մեջ բավականին մեծ ազդեցություն ունի գետի հոսքի արագությունը: Այն նպաստում է նաև ֆիտոպլանկտոնային համակեցությունում բենթոսային և պլանկտոնաբենթոսային ջրիմուռների մշտական առկայությանն ու քանակական առավելությանը:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Հայաստանի բնաշխարհ: Հայկական հանրագիտարան: Երևան, 691 էջ, 2006:
2. *Խաչիկյան Թ.Գ.* Սևանա լճի ջրիավաք ավազանի գետերի ֆիտոպլանկտոնի արդի բնութագիրը, Թեկ. ատ., Երևան, 140 էջ, 2013:
3. *Абакумов В.А.* Руководство по методам гидробиологического анализа поверхностных вод и донных отложений. Ленинград. “Гидрометеиздат”, с. 78- 86, 1983.
4. *Барина С.С., Медведева Л.А.* Атлас водорослей - индикаторов сапробности. (Российский Дальний Восток). Владивосток. Дальнаука, 364 с, 1996.
5. *Барина С.С., Медведева Л.А., Анисимова О.В.* Биоразнообразие водорослей-индикаторов окружающей среды. Тель-Авив, 498 с., 2006.
6. *Гецен М.В.* Водоросли в экосистемах Крайнего Севера., Л. Наука, 165 с., 1985.
7. *Ермолаев В.И.* Фитопланктон р. Пясины (Западный Таймыр). Новые данные о фитогеографии Сибири. Новосибирск, Наука, с. 16-29, 1981.
8. *Киселев И.А., Зинова А. Д., Курсанов Л.И.* Определитель низших растений. Водоросли. М., Сов. Наука, 2, 312 с., 1953.
9. *Прошкина-Лавренко А.И., Макарова И.В.* Водоросли планктона Каспийского моря. Л., Наука, 291 с., 1986.
10. *Харитонов В.Г.* Диатомовые водоросли бассейна р. Анадырь (Чукотский автономный округ). Автореф. дис. канд. биол. наук. Л., 20 с., 1981.
11. *Хачикян Т.Г., Мамян А.С., Гамбарян Л.Р.* Эколого-географическая характеристика и видовой состав диатомовых водорослей некоторых рек Армении."Актуальные проблемы современной альгологии", Украина, Киев., с. 315-316, 2012.
12. *Царенко П.М.* Краткий определитель хлорококковых водорослей Украинской ССР. “Наукова думка”. 206 с., 1990.
13. *Cornell H.V., Lawton J.H.* Species interactions, local and regional process, and limits to the richness of ecological communities: a theoretical perspective. J. Animal Ecology, 61, p.112, 1992.
14. *Sommer U.* The role of competition for resources in phytoplankton succession. Plankton. Ecology: succession in plankton communities. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo: Springer-Verlag, p. 57-107, 1989.
15. *Sørensen T.* A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content. K. danske vidensk Selsk., 5, 4, p. 1-34, 1948
16. *Streble H., Krauter D.* Das Leben im Wassertropfen, Stuttgart, Kosmos, 415 p., 2001.

Ստացվել է 20.10.2015



Biolog. Journal of Armenia, 1 (68), 2016

CHANGES IN SPHINGOMYELIN AND PHOSPHATIDYLCHOLINE CONTENT IN RAT LIVER NUCLEAR STRUCTURES DURING THE *IN VIVO* ACTION OF CISPLATIN

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 content of sphingomyelin and phosphatidylcholine in rat liver nuclear membranes, nuclear matrix and chromatin was studied during the *in vivo* action of cisplatin. It was shown that the action of antitumor agent lead to decrease of content of both sphingolipids in all studied nuclear structures. At the same time the sphingomyelin: phosphatidylcholine ratio was also significantly (nearly twice) decreased.

*Cisplatin – sphingomyelin – phosphatidylcholine – nuclear membrane –
nuclear matrix – chromatin*

Հետազոտվել է առնետի լյարդի կորիզաթաղանթի, կորիզային մատրիքսի և քրոմատինի սֆինգոմիելինի և ֆոսֆատիդիլխոլինի բաղադրությունը հակառնոուցքային միացություն ցիսպլատինի *in vivo* ազդեցության դեպքում: Ցույց է տրված, որ ցիսպլատինի ազդեցությունը բերում է ուսումնասիրված կորիզային կառույցներում նշված սֆինգոլիպիդների բաղադրության զգալի նվազման: Միաժամանակ զգալիորեն (մոտ երկու անգամ) փոքրանում է նաև սֆինգոմիելին: ֆոսֆատիդիլխոլին քանակական հարաբերությունը:

*Ցիսպլատին – սֆինգոմիելին – ֆոսֆատիդիլխոլին – կորիզաթաղանթ –
կորիզային մատրիքս – քրոմատին*

Изучено *in vivo* воздействие противоопухолевого препарата цисплатина на содержание сфинголипидов и фосфатидилхолина в препаратах ядерных мембран, ядерного матрикса и хроматина клеток печени крыс. Показано, что цисплатин приводит к заметному снижению содержания обоих сфинголипидов в трех изученных ядерных структурах. Одновременно значительно (примерно вдвое) уменьшается также количественное соотношение сфингомиелин : фосфатидилхолин.

*Цисплатин – сфингомиелин – фосфатидилхолин – ядерная мембрана –
ядерный матрикс – хроматин*

It is well known that the sphingolipids are very active biological compounds and important components of various membranes which are participated in many processes such as cell proliferation, differentiation, intracellular signal transduction and cell death [1, 5, 15, 19]. They also occupy the principal position among the apoptotic regulators [15, 19], taking into account that the sphingomyeline metabolites such as ceramide and sphingosine

are proapoptotic poisons [2, 3, 15]. The phosphatidylcholine-sphingomyelin metabolism cross-talk inside the nucleus was also well investigated and the alteration of phosphatidylcholine : sphingomyelin ratio during the cell cycle was clearly demonstrated [3].

These above-mentioned facts confirm the importance of investigation of sphingolipids content alterations in various nuclear structures (nuclear membranes, nuclear matrix and chromatin) caused by *in vivo* action of antitumour factor cisplatin in rat liver cells.

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 1000 g animal weight. Rats were decapitated after 24 hours of cisplatin injection. Rat liver nuclei preparations were isolated by the method of Blobel and Potter [10]. Nuclear membranes were isolated by the method of Berezney et al [8], nuclear matrix preparations were isolated from purified nuclei by the method of Berezney and Coffey [7] and chromatin was isolated by the method of Umansky et al [20]. Phospholipid extraction was carried out by Bligh and Dayer [9]. The fractionation of phospholipids were carried out by micro thin layer chromatography (micro TLC) using L silicagel, 6 x 9 cm² plates with the thickness of layer 5-7 mm, using chloroform-methanol-water in ratio 65:25:4 as a dividing mixture. After the chromatography the plates were dried up at 20°C and were treated by 15.6 % CuSO₄ in 8 % phosphoric acid. 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. The high metabolic activity in nuclei is preserved by the presence of numerous different enzymes including those that regulate the lipid metabolism. Many of these enzymes are targets for cisplatin action so as this chemotherapeutic agent is able to act on various pathways of lipid metabolism in nuclei [18]. The decrease of total phospholipid quantity under the *in vivo* action of cisplatin in rat liver nuclear membranes, nuclear matrix and chromatin was demonstrated in our previous studies [12, 13, 14]. Those results demonstrated that cisplatin *in vivo* action provoked quantity changes almost in all individual phospholipids in rat liver nuclear fractions. Taking into consideration the above-mentioned literature data we concentrated our attention especially on alterations in sphingolipids content in nuclear membrane, nuclear matrix and chromatin fractions of liver cells (tabl.1).

Table 1. The content of phosphatidylcholine and sphingomyelin (in micrograms per gram of tissue) and the sphingomyelin : phosphatidylcholine ratio in rat liver nuclear membrane, nuclear matrix and chromatin fractions before and after the cisplatin *in vivo* action.

Nuclear fractions	Sphingomyelin content		Phosphatidylcholine content		The sphingomyelin: phosphatidylcholine ratio	
	Baseline	Cisplatin	Baseline	Cisplatin	Baseline	Cisplatin
Nuclear membrane fraction	217,50±9,23	*111,00±5,13	500,25±21,22	466,20±21,55	0,435	0,238
Nuclear matrix fraction	14,11±0,42	*7,00±0,20	14,78±0,44	*12,00±0,34	0,955	0,583
Chromatin fraction	13,72±0,36	*7,64±0,25	29,40±0,78	*25,60±0,83	0,467	0,298

*p < 0.01

These results showed the different measure of decrease in sphingomyelin and phosphatidylcholine amount in all studied nuclear fractions caused by cisplatin treatment. The sphingomyelin content considerably decreased (nearly twice in all studied nuclear fractions), while in case of phosphatidylcholine the diminution was less than 20 % (tabl. 1). It means that cisplatin *in vivo* treatment resulted a new status of nuclear lipid metabolism. This new metabolic state may be the consequence of some processes which concern the sensitivity of some nuclear enzymes such as sphingomyelinase or sphingomyelin-synthase to cisplatin. Changes of activity of these enzymes may lead to increase the transfer of phosphorylcholine group from sphingomyelin to phosphatidylcholine to a certain extent. At the same time it is well-known that the major metabolic product of sphingomyelin is ceramide, which is generated by nuclear sphingomyelinase and triggers apoptosis and other metabolic changes [3, 4, 6, 16]. Finally, the significant decrease of sphingomyelin : phosphatidylcholine ratio (tabl. 1) may affect on fluidity of nuclear membrane which in its turn may lead to appreciable metabolic exchange between nuclei and cytoplasm.

REFERENCES

1. Adan-Gokbulur A., Kartal-Yandim M., Iskender G., Baran Y. Novel Agent Targeting Bioactive Sphingolipids for the Treatment of Cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 20, p.108-122, 2013.
2. Albi E., Cataldi S., Bartoccini E., Magni M.V., Marini F., Mazzoni F., Rainaldi G., Evangelista M., Garcia-Gil M. Nuclear sphingomyelin pathway in serum deprivation-induced apoptosis of embryonic hippocampal cells. *J. Cellular Physiol.*, 206, p.189-195, 2006.
3. Albi E., Lazzarini A., Lazzarini R., Floridi A., Damaskopoulou E., Curcio F., Cataldi S. Nuclear lipid microdomain as place of interaction between sphingomyelin and DNA during liver regeneration. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, p.6529-6541, 2013.
4. Albi E., Lazzarini R., Viola Magni M. Phosphatidylcholine/sphingomyelin metabolism crosstalk inside the nucleus. *Biochem. J.*, 410, 381-389, 2008.
5. Alessenko A.V. The potential role for sphingolipids in neuropathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry (Moscow), supplement series B: Biomedical Chemistry*, 7, 2, p.108-123, 2013.
6. Alessenko A.V., Burlakova E.B. Functional role of phospholipids in the nuclear events. *Bioelectrochemistry*, 58, pp.13-21, 2002.
7. Berezney R., Coffey D.S. The nuclear protein matrix: Isolation, structure and functions. *Adv. Enzyme Regul.*, 14, 63-100, 1976.
8. Berezney R., Funk L.K., Crane F.H. Isolation of nuclear membrane from a large scale preparation of bovine liver nuclei, 203, 3, p.531-546, 1970.
9. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Biochem. Physiol.*, 37, p.911-917, 1959.
10. Blobel G., Potter V.R. Nuclei from rat liver: Isolation method that combines purity with high yield. *Science*, 154, pp.76-79, 1966.
11. Florea A-M, Busselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*, 3, pp.1351- 1371, 2011.
12. Gevorgyan E.S., Hovhannisyan A.G., Yavroyan Zh.V., Hakobyan N.R. Action of cisplatin on phospholipid content in rat liver and thymus Chromatin. *Electronic Journal of Natural Sciences*, 19, 2, p.3-6, 2012.
13. Gevorgyan E.S., Hovhannisyan A.G., Yavroyan Zh.V., Sargsyan E.G., Hakobyan N.R. Cisplatin action on phospholipid content in rat liver and thymus nuclear membranes. *Electronic Journal of Natural Sciences*, 21, 2, p.14-16, 2013.

14. *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. *Electronic Journal of Natural Sciences*, 22, 1, pp. 8-11, 2014.
15. *Giussani P., Tringali C., Riboni L., Viani P., Venerando B.* Sphingolipids: key regulators of apoptosis and pivotal players in cancer drug resistance. *Int.J.Mol.Sci.*, 15, p.4356-4392, 2014.
16. *Ledeen R.W., Wu G.* Nuclear sphingolipids: metabolism and signaling. *Journal of Lipid Research*, 49, 1176-1186, 2008.
17. *Miller R.P., Tadagavadi R.K., Ramesh G., Reeves W.B.* Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins*, 2, p.2490- 2518, 2010.
18. *Plathow Ch., Weber W.A.* Tumor cell metabolism imaging. *Journal of Nuclear Medicine*, 49, p. 43-63, 2008.
19. *Tirodkar T.S., Voelkel-Johnson C.* Sphngolipids in apoptosis. *Exp. Oncol.*, 34, 3, p.231-242, 2012.
20. *Umansky S.R., Kovalev J.J., Tokarskaya V.Y.* Specific interaction of chromatin non-histone proteins with DNA. *Bioch. Bioph. Acta*, 383, 3, p.242-248, 1975.

Received on 13.10.2015



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1(68), 2016

ՄՆՆԴԱԼՈՒԾՈՒՅԹԻ ԽՏՈՒԹՅԱՆ ԱԶԴԵՅՈՒԹՅՈՒՆԸ *CALLISIA FRAGRANS*
ԴԵՂԱԲՈՒՅՄԻ ԱՐԴՅՈՒՆԱՎԵՏՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ
ԱՆՀՈՂ ՄՇԱԿՈՒՅԹԻ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Ա.Ս. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ

ՀՀ ԳԱԱ Գ.Ս. Դավթյանի անվան հիդրոպոնիկայի պրոբլեմների ինստիտուտ hydropinstitute@gmail.com

Անհող մշակույթի պայմաններում ուսումնասիրվել է Դավթյանի սննդալուծույթի տարբեր խտությունների (0,5 Ն, 0,75 Ն, 1,0 Ն, 1,25 Ն) ազդեցությունը *Callisia fragrans* դեղաբույսի արդյունավետության վրա: Հետազոտությունների արդյունքում ավելի նոսր սննդալուծույթով սնուցված բույսերի մոտ գրանցվել են դեղահումքի բարձր արդյունավետություն և ֆիզիոլոգիական գործ-ընթացների ակտիվացում: Դեղահումքի բարձր արդյունավետության շնորհիվ էքստրակտիվ նյութերի և դաբաղանյութերի առավելագույն ել ապահովել է 0,5 Ն տարբերակը և գերազանցել մյուսներին համապատասխանաբար 1,1-2,4 և 1,4-2,2 անգամ:

Callisia fragrans – անհող մշակույթ – սննդալուծույթ – խտություն – արդյունավետություն

В условиях беспочвенной культуры изучено влияние различных концентраций (0,5 Н, 0,75 Н, 1,0 Н, 1,25 Н) питательного раствора Давтяна на продуктивность лекарственного растения *Callisia fragrans*. В результате исследований у растений, подпитываемых более слабым питательным раствором, отмечались высокая продуктивность лекарственного сырья и активизация физиологических процессов. Благодаря высокой продуктивности лекарственного сырья, максимальный выход экстрактивных и дубильных веществ обеспечивал вариант 0,5 Н, который превышал остальные в 1,1-2,4 и 1,4-2,2 раза соответственно.

Callisia fragrans – беспочвенная культура – питательный раствор –

концентрация – продуктивность

The influence of different concentration of Davtyan's nutrient solution (0.5 N, 0.75 N, 1.0 N, 1.25 N) on the productivity of herb *Callisia fragrans* has been studied in soilless culture conditions. In the result of investigations high productivity of raw medicinal material and activation of physiological processes has been registered in plants nourished with more dilute solution. Due to high productivity of raw medicinal material, 0.5 N variant has provided maximum output of extractives and tannins, and which has exceeded the others by 1.1-2.4 and 1.4-2.2 times, respectively.

Callisia fragrans – soilless culture – nutrient solution – concentration – productivity

Անհող մշակույթի պայմաններում, հնարավորություն ունենալով պարզաբանել բույսերի հանքային սննդառության բարդ խնդիրները, կարելի է բացահայտել դրանց արդյունավետության բարձրացման մեխանիզմները [4, 6, 9, 12, 13]: Գոյություն ունեն շուրջ 1000 սննդալուծույթներ, որոնք միմյանցից տարբերվում են ոչ միայն կազմով, այլ նաև սննդարար տարրերի հարաբերությամբ: Արդյունաբերական հիդրոպոնիկայում կիրառվող սննդալուծույթներից առավել հայտնի են Դավթյանի, Կնոպի, Հելրիգելի, Պրյանիշնիկովի, Չեսնոկովի և Բազիլինայի, Ստենների, Բենտլիի և այլ լուծույթներ [3, 4,

8, 11]: Սննդալուծության խտությունը կարևորագույն գործոն է հանդիսանում արմատների կողմից սննդարար տարրերի կլանման գործընթացում: Տարբեր մշակաբույսերի համար սննդալուծության օպտիմալ խտությունը տարբեր է, և անգամ միևնույն բույսի համար այն կարող է փոխվել օնտոգենեզի ընթացքում: Սննդալուծության խտությունից է կախված նրա օսմոտիկ ճնշումը, որը պետք է ավելի փոքր լինի, քան բջջահյուսքի օսմոտիկ ճնշումը: Հակառակ դեպքում հնարավոր է ոչ միայն բույսերի կողմից ջրի և հանքային տարրերի կլանման ընդհատում, այլ նույնիսկ արմատների միջոցով ջրի հետհոսք դեպի արտաքին միջավայր [4, 6]: Յուրաքանչյուր մշակաբույսի համար օպտիմալ սննդալուծության ընտրությունը և կիրառումը կարող են նպաստել բույսերի կողմից հանքային տարրերի առավելագույն կլանմանը և յուրացմանը՝ բավարարելով բույսի այս կամ այն միկրո և մակրոտարրի նկատմամբ պահանջը: Այս ամենը կխթանի բույսի աճի և զարգացման, ինչպես նաև կենսասինթետիկ պրոցեսների նորմալ ընթացքը:

Սույն աշխատանքի նպատակն է հետազոտել *Callisia fragrans* (Lindl.) Woodson դեղաբույսի աճեցման արդյունավետությունը բացօթյա հիդրոպոնիկայում Դավթյանի սննդալուծության տարբեր խտությունների կիրառման պայմաններում:

Նյութ և մեթոդ: Փորձարկվել են ակադեմիկոս Գ.Ս. Դավթյանի կողմից մշակված սննդալուծության [3] տարբեր խտություններ՝ 0,5 Ն, 0,75 Ն, 1,0 Ն, 1,25 Ն: Կիրառվել են բույսի հիդրոպոնիկ ճանապարհով ստացված տնկանյութերը: Փորձերը դրվել են 0,16 մ² սնման մակերես ունեցող հիդրոպոնիկական վեգետացիոն անոթներում (տնկարկի 12բույս/ մ² խտությամբ): Որպես աճեցման միջավայր կիրառվել է 3-15 մմ մասնիկների տրամագծով գլաբարի և հրաբխային կարմիր խարամի 1:1 ծավալային հարաբերությամբ խառնուրդը: Փորձերը դրվել են 5 կրկնություններով: Կատարվել են ֆիզիոլոգիական և դեղաքիմիական հետևյալ համալիր վերլուծությունները. կանաչ զանգվածում որոշվել է ջրի ֆրակցիոն կազմը, բջջահյուսքի օսմոտիկ ճնշումը՝ ըստ Գուսնի [2], ֆոտոսինթետիկ գունանյութերի պարունակությունը՝ ըստ Վետշտայնի [14], չոր դեղա- հումքում՝ դաբաղանյութերի, էքստրակտիվ նյութերի և խոնավության պարունակությունը [1, 10]: Ստացված արդյունքները ենթարկվել են մաթեմատիկական մշակման՝ GraphPad Prism 6 համակարգչային ծրագրով:

Արդյունքներ և քննարկում: Գիտափորձերի արդյունքում պարզվել է, որ նոսր սննդալուծությամբ սնուցված բույսերի մոտ դիտվել է ավելի ինտենսիվ աճ և զարգացում: 0,5 Ն, 0,75 Ն և 1,0 Ն տարբերակների միջև ըստ դեղահումք համարվող ընձյուղների և տերևների թարմ և չոր զանգվածների, էական տարբերություն չի գրանցվել: Մինչդեռ 1,25 Ն տարբերակը տերևների (թարմ՝ 2,1 և չոր՝ 1,9) և ընձյուղների (թարմ՝ 2,3 և չոր՝ 2,4) զանգվածով էապես զիջել է համապատասխանաբար 0,75 Ն և 0,5 Ն տարբերակներին (աղ. 1):

Աղյուսակ 1. Սննդալուծության տարբեր խտությունների ազդեցությունը *Callisia fragrans*-ի արդյունավետության վրա, գ/բույս

Տարբերակներ, Ն	տերև		ընձյուղ (դեղահումք)*		ընձյուղ (ընդհանուր)	
	թարմ	չոր	թարմ	չոր	թարմ	չոր
0,5	920,7 ^{ab}	56,5 ^{ab}	576,6 ^a	36,2 ^a	928,7 ^a	53,9 ^a
0,75	1142,3 ^a	68,8 ^a	495,4 ^{ab}	30,7 ^{ab}	1067,3 ^a	57,8 ^a
1,0	890,3 ^{ab}	57,2 ^{ab}	487,5 ^{ab}	27,7 ^{ab}	935,8 ^a	48,7 ^{ab}
1,25	533,6 ^b	35,9 ^b	251,1 ^b	15,3 ^b	446,9 ^b	25,4 ^b

^{ab}Tukey's Multiple Comparision Test ($p < 0.05$)

* դեղահումք են համարվում բույսի՝ 9 և ավելի հանգույցներ ունեցող դարչնամանուշակագույն ընձյուղները [7]

Ֆիզիոլոգիական վերլուծությունների համար վերցվել է միջին նմուշ հիմնական բույսի և դրանից սկիզբ առնող կողային ընձյուղների տերևներից: Վերլուծությունների արդյունքում պարզվել է, որ ընդհանուր ջրի պարունակությունը շատ քիչ փոփոխություն է կրել փորձարկված բոլոր տարբերակներում, մինչդեռ սննդալուծության խտության մեծացմանը զուգընթաց դիտվել է ազատ ջրի պարունակության նվազում և կապված ջրի պարունակության աճ՝ տատանվելով, համապատասխանաբար, 57,4-65,1% և 28,7-36,2%-ի սահմաններում: Հայտնի է, որ բույսերի նորմալ աճի և զարգացման համար կարևոր է ոչ միայն ընդհանուր ջրի պարունակու-

թյունը, այլև նրա շարժունության աստի-ճանը. որքան մեծ է բույսերում հեշտ դուրս բերվող ջրի մասնաբաժինը, այնքան բարձր է տերևների ֆիզիոլոգիական ակտիվությունը [4, 5]: Ազատ ջրի առավելագույն պարունակություն (65,1 %) գրանցվել է 0,5 Ն տարբերակում, որը գերազանցել է մյուս տարբերակներին 3,8-11,8 %-ով: Սննդալուծույթի խտությունը ազդեցություն է ունեցել նաև բջջահյուսքի օսմոտիկ ճնշման վրա: Սննդալուծույթի խտության մեծացմանը զուգ-ընթաց այն աճել է: Բջջահյուսքի օսմոտիկ ճնշման նվազագույն արժեք գրանցվել է 0,5 Ն տարբերակում, որը զիջել է մյուսներին 16,2-62,8 %-ով: Գունասպինթետիկ նյութերի՝ քլորոֆիլի և կարոտինոիդների սինթեզի տեսանկյունից որևէ օրինաչափություն չի գրանցվել (աղ. 2):

Աղյուսակ 2. Սննդալուծույթի տարբեր խտությունների ազդեցությունը *Callisia fragrans*-ի ֆիզիոլոգիական ցուցանիշների վրա

Ցուցանիշներ	Տարբերակներ			
	0,5 Ն	0,75 Ն	1,0 Ն	1,25 Ն
Ընդհանուր ջրի պարունակությունը, %	93,8	93,9	94,2	93,6
Ազատ ջրի պարունակությունը, %	65,1	62,6	61,1	57,4
Կապված ջրի պարունակությունը, %	28,7	31,3	33,1	36,2
Ազատ ջուր/կապված ջուր	2,3	2,0	1,8	1,6
Բջջահյուսքի օսմոտիկ ճնշում, մթն	1,48	1,72	1,96	2,41
Քլորոֆիլ (a), մգ%	23,2	33,0	24,4	34,5
Քլորոֆիլ (b), մգ%	10,5	14,3	10,2	14,3
Քլորոֆիլ (a+b), մգ%	33,7	47,3	34,6	48,8
Կարոտինոիդներ, մգ%	14,8	13,4	12,4	13,4

Դեղաքիմիական վերլուծությունների համար օբյեկտ են հանդիսացել բույսի օղաչոր ընձյուղները. կիրառվել են ընձյուղների՝ դեղահումք համարվող հատվածները [7]: 1,0 Ն սննդալուծույթով սնուցված բույսերի մոտ գրանցվել է էքստրակտիվ նյութերի առավելագույն պարունակություն, որը մյուս խտություններին գերազանցել է 1,2 անգամ: Դաբադանյութերի կուտակման տեսանկյունից աչքի են ընկել սննդալուծույթի ամենանոսր՝ 0,5 Ն և ամենախիտ՝ 1,25 Ն տարբերակները, որտեղ դաբադանյութերի պարունակությունը կազմել է համապատասխանաբար 1,1 և 1,2 %: Միաժամանակ դեղահումքի ցածր արդյունավետության պատճառով 1,25 Ն տարբերակի մոտ ցածր է եղել մեկ բույսից ստացվող նյութի ելը: Երկրորդային ծագման նյութերի առավելագույն ել ապահովել է 0,5 Ն տարբերակը: Նշված տարբերակը դաբադանյութերի ելով գերազանցել է մյուս տարբերակներին 1,4-2,2 անգամ, իսկ էքստրակտիվ նյութերի ելով 1,1-2,4 անգամ: Դեղա-քիմիական վերլուծությունների արդյունքում պարզվել է, որ կիրառված սննդալուծույթի տարբեր խտությունները էական ազդեցություն չեն ունեցել խոնավության տոկոսային պարունակության վրա (աղ. 3):

Աղյուսակ 3. Սննդալուծույթի տարբեր խտությունների ազդեցությունը *Callisia fragrans*-ի երկրորդային ծագման նյութերի սինթեզի վրա

Տարբերակներ, Ն	Էքստրակտիվ նյութեր		Դաբադանյութեր		Խոնավություն
	%	գ/բույս	%	գ/բույս	
0,5	32,6	11,8	1,1	0,40	10,3
0,75	32,0	9,8	0,9	0,28	8,7
1,0	39,7	11,0	0,7	0,19	9,6
1,25	33,0	5,0	1,2	0,18	8,8

Այսպիսով, դեղահումքի արդյունավետությամբ 0,5 Ն, 0,75 Ն և 1,0 Ն տարբերակների միջև էական տարբերություն չի գրանցվել, սակայն սննդալուծույթի խտության մեծացմանը զուգընթաց նվազել է ֆիզիոլոգիական գործընթացների ակտիվությունը: Դաբադանյութերի և էքստրակտիվ նյութերի առավելագույն ել ապահովել է 0,5 Ն տարբերակը և գերազանցել մյուսներին, համապատասխանաբար, 1,4-2,2 և 1,1-2,4 անգամ: Դավթյանի 1,25 Ն սննդալուծույթը բացասաբար է անդրադարձել դեղահումքի արդյունավետության և ֆիզիոլոգիական ցուցանիշների վրա: Թեև վերոնշյալ տարբերակը երկրորդային ծագման նյութերի պարունակությամբ որոշ դեպքերում գերազանցել է մյուսներին, սակայն վերջիններին մոտ դեղահումքի բարձր արդյունավետության հաշվին բարձր է ստացվել նաև այդ նյութերի ելը:

Աշխատանքը կատարվել է ՀՀ ԿԳՆ ԳՊԿ-ի կողմից տրամադրվող ֆինանսական աջակցության շնորհիվ՝ 13-1F063 գիտական թեմայի շրջանակներում:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Государственная фармакопея СССР, XI изд., выпуск 2. М., Медицина, 1990, www.fito.nnov.ru/pharmacopaea
2. Гусев Н.А. Методы исследования водообмена растений. - Казань, изд-во Казанского ун-та, 1989.
3. Давтян Г.С. Гидропоника. В кн.: Справочная книга по химизации сельского хозяйства. М., Колос, 1980.
4. Майрапетян С.Х. Культура эфиромасличных растений в условиях открытой гидропонии. АН Армении, Ереван, 1989.
5. Майрапетян С.Х., Алексанян Д.С. Водный режим растений в условиях открытой гидропонии. АН Армении, Ереван, 1991.
6. Майрапетян С.Х., Татевосян А.О. Оптимизация минерального питания растений в условиях гидропонии. Ереван: изд. Гитутюн НАН РА, 1999.
7. Огарков В. Все о золотом усе. М., ООО "АСС-Центр", 2004.
8. Стейнер А. О составе питательного раствора. Сообщения ИАПиг, № 26, изд-во НАН РА, Ереван, с. 3-19, 1995.
9. Татевосян А.О. Оптимизация минерального питания растений хна, басма, лимонное сорго в условиях гидропонии. Автореф. канд. дис., Ереван, 1996.
10. Химический анализ лекарственных растений (под ред. Гринкевича Н.И.), М. "Высшая школа", 1983.
11. Чесноков В.А., Базырина Е.Н., Бушуева Т.М., Ильинская Н.Л. Выращивание растений без почвы, Л., ЛГУ, 1960.
12. Mairapetyan S., Tadevosyan A. Medicinal plants in hydroponics. Practical Hydroponics and Greenhouses, Australia, 44, p. 71-73, 1999.
13. Mairapetyan S.K., Tadevosyan A.H., Alexanyan J.S., Stepanyan B.T. Optimization of the N,P,K ratio in the nutrient medium of some soilless aromatic and medicinal plants. Acta Horticulture, 502, WOKMAP II, Belgium, Part. 3, p. 29-32, 1999.
14. Wettstein D. Chlorophyll lefle und der submicrobische formishce der Plastiden. Exp. Cell Research, 12, 1957.

Ստացվել է 27.07.2015



Biolog. Journal of Armenia, 1 (68), 2016

EFFECT OF EXTREMELY HIGH FREQUENCY EMI ON LIPID PEROXIDATION AND ACTIVITIES OF ANTIOXIDANT ENZYMES OF WHEAT SHOOTS

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

*Yerevan State University, Department of Biophysics
zhanna.muxaelyan@gmail.com*

The investigation of the electromagnetic irradiation (EMI) with extremely high frequencies (EHF)- 41.8 GHz, 42.2 GHz, 50.3 GHz and 51.8 GHz and low intensity flux capacity (0.6 mW.cm^{-2}) of seeds and growth of germs of wheat (*Triticum aestivum* L.) has been carried out. The effect of EMI on lipid peroxidation and antioxidant system function of wheat shoot cells has been also studied. It has been shown that at irradiation of germinating seeds the increasing of wheat germ mass as well as lipid peroxidation rate is observed. At the same time EMI-induced oxidative stress was indicated by the markedly change of catalase (CAT) activity depending on EMI frequency used and exposure duration.

Extremely high-frequency electromagnetic irradiation – Triticum aestivum L. – wheat germ shoot mass – catalase activity

Ուսումնասիրվել է ծայրահեղ բարձր հաճախականության (ՄԲՀ)- 41.8 ԳՀց, 42.2 ԳՀց, 50.3 ԳՀց և 51.8 ԳՀց և ցածր հոսքի խտությամբ 0.6 մՎտ.սմ^{-2} էլեկտրամագնիսական ճառագայթման (ԷՄՃ) ազդեցությունը ցորենի (*Triticum aestivum* L.) ծիլերի աճի վրա: Հետազոտվել է նաև ԷՄՃ ազդեցությունը ցորենի ծիլերի բջիջներում լիպիդների պերօքսիդային օքսիդացման ինտենսիվության և հակաօքսիդանտային համակարգի ֆունկցիաների վրա: Ցույց է տրվել, որ ծլող սերմերի ճառագայթահարումը բերում է ծիլերի զանգվածի, դրանցում լիպիդների պերօքսիդային օքսիդացման ինտենսիվության աճի: ԷՄՃ-ինդուկցված օքսիդատիվ սթրեսը արտահայտվում է նաև կատալազի ակտիվության նշանակալի փոփոխությամբ՝ կախված կիրառված հաճախականությունից և ճառագայթահարման տևողությունից:

Ծայրահեղ բարձր հաճախականության էլեկտրամագնիսական ճառագայթում – Triticum aestivum L. – ցորենի ծիլերի զանգված – կատալազի ակտիվություն

Исследовалось влияние ЭМИ КВЧ-диапазона (41.8 ГГц, 42.2 ГГц, 50.3 ГГц и 51.8 ГГц) с плотностью потока мощности 0.6 мВт.см^{-2} на рост семян пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Изучалось также воздействие ЭМИ на интенсивность процессов перекисного окисления липидов и функционирование антиоксидантной системы клеток проростков пшеницы. Установлено, что облучение прорастающих семян приводит к увеличению массы проростков и к усилению перекисного окисления липидов. При этом индуцированный ЭМИ оксидативный стресс приводил к определенному изменению активности каталазы в зависимости от частоты и длительности ЭМИ-воздействия.

ЭМИ КВЧ-диапазона – Triticum aestivum L. – вес проростков – активность каталазы

Nowadays the increasing number of artificial sources, structures and appliances that emit in EMI range of the electromagnetic spectrum, as well as using the radio-frequency part of spectrum, make the investigation of EHF irradiation influence on living matter very important.

The majority of researchers have shown that all membranes of different objects serve as the main location of influence for radiation in mm range: primary mechanisms which determine final effect of radiation in mm range influence are developed in the membranes [see for review [1] and references therein and [10]. It has been shown that EMI leads to changes of membrane properties: to acceleration or suppression in active ions transport, to changes in biological membranes permeability due to proteins conformation changes and by means of membrane lipid peroxidation [4-6, 9, 13].

Although a lot of reports regarding influence of EMI EHF are available, to our knowledge the mechanisms of induction of biological effects of high plants are not clear yet. Keeping in view the importance of wheat as a valuable yield crop and MM-waves as an environmental factor, the present study was designed to test effects of different EMI frequencies on growth (mass), lipid peroxidation and the activity of catalase in growing wheat shoots.

Materials and methods. *Plant Culture and Electromagnetic Irradiation Procedure:* The seeds of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) of "Bezostaya" variety were used in experiments. The germination of seeds was released in thermostat at 25°C on wet filter paper in Petri dishes as it is described in [8]. The non-irradiated germinating seeds and seedlings were taken as control samples. Experimental samples- 2-, 3- and 4-day-old seedlings were irradiated every day 20 min with coherent electromagnetic waves of 41.8, 42.2, 50.3 and 51.8 GHz frequencies using a generator G4-141 type with working interval of 37.50-53.57 GHz (State Scientific-Production Enterprise "Istok", Russia) and power flux density 0.6 mW·cm⁻².

Plant Extract preparation: The procedure of the plant extract preparation can be found in [8]. The supernatant of shoots homogenate was used for assessing the protein content by [11] and CAT activity using UV-visible Spectrophotometer (model SF-46, USSR).

Analyses of lipid peroxidation: Lipid peroxidation in shoots was determined by estimation of the MDA content following the method of Costa H. [8] with slight modification [12].

Catalase activity assays: Catalase CAT (EC 1.11.1.6) activity was measured by the method of Korolyuk M. [3], which is based on the reaction of the H₂O₂ in a mixture with ammonium molybdate ((NH₃)₂.MoO₄).

Results and Discussion. *EMI effects on the growth of wheat plants:* Effects of EHF EMI on growth wheat's shoots were carried out of 2-, 3- and 4-day-old plants. Growth intensity defined by mass of beforehand irradiated seeds shoots showed significant differences as compared with control, especially at the higher frequencies of EMI.

In case of irradiation with 42.2 GHz frequency the mass of germ shoots increases by 30% in the 3-day-old plants after seeds irradiation compared with the 2-day-old plants and by 74% in the fourth day after irradiation compared with the third day. At irradiation with 50.3 GHz these parameters were 30% and 74% and at irradiation with 51.8 GHz- 38% and 91% respectively. Besides, the activation of seedlings growth intensity showed the most magnitude value in 4-day-old plants at 50.3 GHz and 51.8 GHz frequencies, which are the water resonant frequencies as it is known well [1]. These and earlier data [14] coincided well.

EMI effects on wheat seedlings cell lipid peroxidation content: It has been revealed that multiple irradiation of germinating seedlings of control seeds induced lipid peroxidation activity increase in germ cells the change magnitude of which depends on irradiation frequency and duration (fig. 1).

Obtained data showed, that EMI results by increase lipid peroxidation process activity, which expressed by MDA rate increasing. So, in case of wheat seedlings' irradiation by 41.8 GHz and 42.2 GHz frequencies MDA concentration showed trend for

increasing for each EMI duration according to the age of the shoots. Thus, in cells of 2- and 3-day-old shoots exposed to EMI by 41.8 GHz frequency the MDA amount increases by 44% and 55% for EMI 60 min summary duration and by 55% and 50% for 80 min duration, correspondingly as compared to control plants. At the same time, in shoots of 4-day-old experimental plants increasing of MDA rate was not observed, which witnessed that lipid peroxidation intensity does not exceed the appropriate control (fig. 1a). Approximately the same phenomenon were observed for 2- and 3-day-old wheat seedlings multiple irradiation with 42.2 GHz frequency (fig. 1b). But, for 4-day-old shoots MDA rate increased by 1.52- and 1.68-fold respectively for 60 min and 80 min EMI duration as compared with control. As it is obvious from fig. 1 (fig. 1, c, d) the greater responses of lipid peroxidation were recognized in case of wheat seedlings EMI by 50.3 GHz and 51.8 GHz frequencies. According to obtained data MDA content significantly ($P < 0.01$) increased in all the expose EMI and this increase reached its maximum at 60 min compared to control. On the other hand, the further irradiation for 80 min results by significant decline of MDA rate in all three ages experimental seedlings studied (fig. 1c, d).

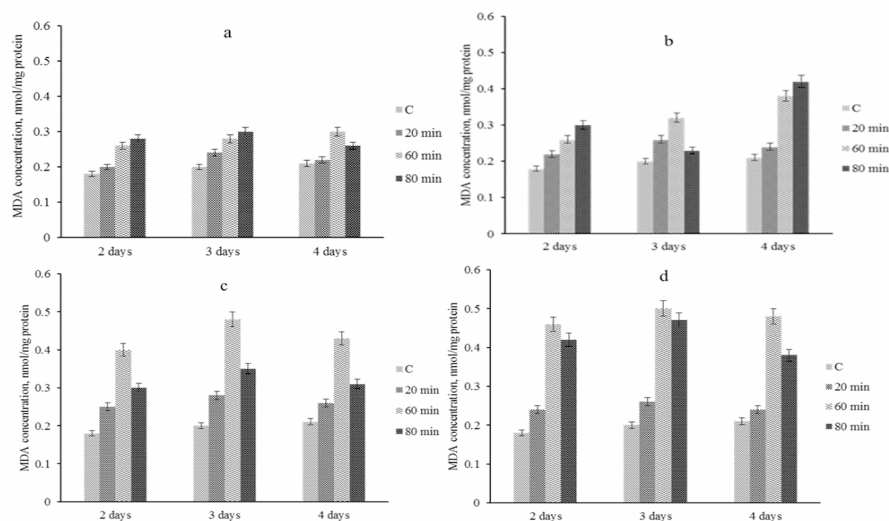


Fig. 1. The dependence of MDA rate in wheat seedlings during their growth on EMI duration with 41.8 GHz (a), 42.2 GHz (b), 50.3 GHz (c) and 51.8 GHz (d) frequencies.

Influence of EMI on catalase activity: It has been revealed that the irradiation of germinating seedlings induces catalase activity increase in them the change magnitude of which depends on EMI frequency and expose duration, as well as on plants age (fig. 2).

From the data represented in fig. 2, it is obvious that in case of irradiation with 41.8 GHz frequency catalase activity noticeable decrease was observed in the 3- and 4-day-old shoots, moreover this fact depends on irradiation duration. Interestingly, in case of EMI with 20 min duration in above mentioned age plants the catalase activity decreased by 13.4% and 6.4% and for 60 min irradiation- by 23.4 % and 13.1 % respectively. The further increase of irradiation duration up to 80 min causes a significant activation of catalase: more than 1.5-times compared to the 60 min duration EMI and by 13% compared to control 3-day-old plants. For the 4-day-old plants the same criteria were 1.33-times and 18% correspondingly. As it is obvious from represented figure (fig. 2c, d) the same regularity was observed during growth of irradiated shoots with 50.3 GHz and 51.8 GHz frequencies, moreover in case of last two EMI frequencies response was grater.

As it is obvious from represented figure (fig. 2, c, d) the same regularity was observed during growth of irradiated shoots with 50.3 GHz and 51.8 GHz frequencies, moreover in case of last two EMI frequencies response was grater.

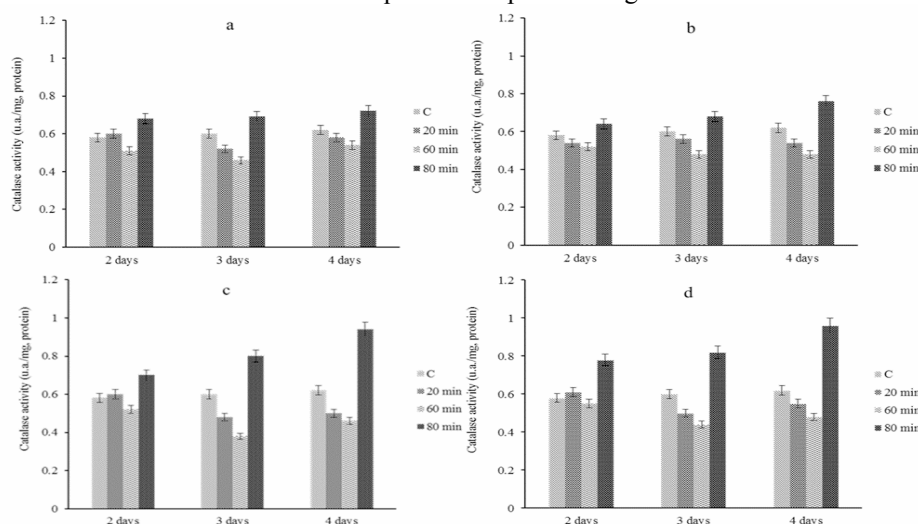


Fig. 2. The dependence of catalase activity in wheat shoots during their growth on EMI duration with 41.8 GHz (a), 42.2 GHz (b), 50.3 GHz (c) and 51.8 GHz (d) frequencies.

So, based on obtained data it is possible to conclude: in all age-plants exposed to EMI decrease of catalase activity is registered for 20- and 60 min exposure duration. Besides, parallel to the increase of EMI duration up to 80 min, enzyme activity increases in tested wheat shoots of the same age. At the same time, the catalase activity showed trend for increasing for each EMI duration, according to the age of the plants. The increasing activity of catalase appeared to be involved in effective scavenging ROS generated by EMI treatments.

The results of our study revealed the stimulation effects of EMI on wheat plants growth and the role of antioxidant defense system in organism's response to external physical field. According to obtained data one-fold EMI of wheat presoaked seeds induces increased shoot mass in all-age studied seedlings, but in the course of time (3-4-day-old shoots) the growth intensity was increased, especially at EMI 50.3 GHz and 51.8 GHz frequencies. This fact indicates that the biological effect of MM EMI on organism level is performed mainly at water resonant frequencies that show a certain role of water in biosystem response reaction [1, 7]. Increased shoots length and weight in winter wheat (*Triticum aestivum* L.), barley (*Hordeum vulgare* L.) and maize (*Zea mays* L.) plants subjected to EMI have been reported [2, 14]. The results of present study are in a good conformity with these data [2, 14].

Obtained data indicated that there was a significant ($p < 0.04$) increase in MDA concentration of EMI exposed plants cell, and this increment was more pronounced at 50.3 GHz and 51.8 GHz, compared to control. In this concern, authors [3, 13] stated that the use of EMI at 42.8 GHz and 50.3 GHz frequencies leads to an accumulation of free radicals such as O_2^- and H_2O_2 which unbalance the system of free radical elimination and thus induce MDA level. Increase in MDA content and antioxidant enzyme- catalase activity under EMI -stress in present study is consistent with the studies [2, 4, 6], in which wheat, barley and maize seeds were grown under EMI and TBAS values and antioxidative enzymes activities were found to increase.

Compering obtained results of MDA level and catalase activity in irradiated plant shoots we can notice that the comparatively increasing rate of MDA parallel to the duration increase for each applied EMI frequency is correlated to the suppression of catalase activity in the shoots of the same age. In the case of 80 min EMI multiple expose data about the sharp increase of catalase activity correlated well to slowdown of MDA level in the shoots of the same age. In plants submitted to external physical field SOD, CAT and GPX act as a defence mechanism which gets activated. The results obtained in current study also demonstrate that catalase protects wheat plant cells from the destructive effects of ROS and constitute key component of the cellular antioxidant defense system.

In conclusion our study showed that increases in mass, lipid peroxidation and catalase activities in *Triticum Aestivum* L. seedlings could be attributed to EHF EMI stress. MDA level change at plants irradiation indicates external physical field's effect on cell membrane properties. The grater response of plant organism was observed at water resonant frequencies which confirms that the primary element of EMI is water. In addition, the results may also suggest that increasing the activity of catalase plays an important role in ROS scavenging process and protect wheat plans against stress.

REFERENCES

1. Девятков Н.Д., Голант М.Б., Бецкий О.В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности. М., Радио и связи, 169 с, 1991.
2. Калье М.И., Влияние КВЧ-излучения миллиметрового диапазона на физиологические процессы прорастание семян пивоваренного ячменя. Автореферат, Новгород: 119 с, 2011.
3. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. Лаб дело, 1, 16-19, 1988.
4. Мартынюк В.С., Темурьянц Н.А. Роль перекисного окисления липидов и тиол-дисульфидного обмена в механизмах антистрессорного действия электромагнитного излучения крайне высокой частоты. Миллиметровые волны в биологии и медицине, 5, 61-69, 1995.
5. Петров И.Ю., Бецкий О.В. Изменение потенциалов плазматических мембран клеток листа зеленого растения при электромагнитном облучении. ДАН СССР, 305, 2, 474-476, 1989.
6. Шаров В.С., Казаринов К.Д., Андреев В.Е., Путвинский А.В., Бецкий О.В. Ускорение перекисного окисления липидов под действием электромагнитного излучения миллиметрового диапазона. Биофизика, 28, 423-427, 1983.
7. Belyaev I. Non-thermal biological effects of mico-waves: Current knowledge, further perspective, and urgent needs, Electromagnetic Biology and Medicine, 24, 375-403, 2005.
8. Costa H., Gallego S.M., Tomaro M.L. Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons, Plant Science, 162, 6, 939-945, 2002.
9. Gill S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant mechnary in abiotic stress tolerance in crop plants, Plant Physiol. Biochem., 48, 909-930, 2010.
10. Guofen Yu., Coln E., Schoenbach K. Gellerman M., Fox P., Rec., L. et al. A study on biological effects of low-intensity millimeter waves, IEEE Transactions on Plasma Science, 30, 1489-1496, 2002.
11. Lowry O.H., Reserbrough N.J., Farr S.L., Rondall R.L. Protein measurement with Folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193, 265-75, 1951.
12. Poghosyan G.H., Mukhaelyan Zh.H., Vardevanyan P.H. Influence of cadmium ions on growth and antioxidant system activity of wheat (*Triticum Aestivum* L.) Seedlings, International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences, 10, 2, 371-378, 2014.

13. Torgomyan H., Trchounian A. *Escherichia coli* MembraneAssociated Energy-dependent processes and sensitivity toward Antibiotics changes as responses to Low-intensity electromagnetic irradiation of 70.6 and 73 GHz frequencies, *Cell BiochemBiophys*, 62, 451-461, 2012.
14. Vardevanyan P., Nerkararyan A., Shahinyan M. Influence of low intensity coherent electromagnetic millimeter waves on growth and peroxidase total activity of wheat germs, *J. of Exp. Biol. And Agricult. Sci.*, 1, 1, 39-44, 2013.

Received on 18.01.2016



Биол. журн. Армении, 1 (68), 2016

БИОТЕСТИРОВАНИЕ ПОЧВ СЮНИКСКОГО МАРЗА АРМЕНИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ МОДЕЛЬНОГО ТЕСТ-ОБЪЕКТА КЛОНА 02 ТРАДЕСКАНЦИИ В СИСТЕМЕ ПОЧВА-РАСТЕНИЕ

Р.Э. АВАЛЯН¹, Э.А. АГАДЖАНЫН¹, А.Л. АТОЯНЦ¹,
А.Л. ГЕВОРКЯН², А.Э. СИМОНЯН¹

¹Ереванский госуниверситет, кафедра генетики и цитологии,
²Лаборатория общей и молекулярной генетики НИИ “Биология”
genetik@ysu.am; a.atoyants@rambler.ru

Исследован уровень генотоксичности почвенных образцов с территории Сюникского марза Армении с применением тестов Трад-ВТН и Трад-МЯ модельного тест-объекта клон 02 традесканции. Установлен высокий уровень генетических эффектов по данным обоих биотестов в почвенных вариантах N1 и N5 по сравнению с контролем и другими вариантами. Выявлена прямая зависимость между частотой маркерных критериев теста Трад-ВТН и теста Трад-МЯ.

Полученные результаты показывают, что тест-система традесканция (клон 02) может быть использована в качестве надежного биоиндикатора генетического мониторинга загрязнения почвы техногенно нарушенных территорий.

*Традесканция (клон 02) – генетические эффекты – система почва-растение
– загрязнение почвы*

Ուսումնասիրվել է Սյունիքի մարզի տարածքների հողային նմուշների գենոթունա-բանական մակարդակը տրադեսկանցիայի (02 կլոն) անդաթելերի մագիկների և միկրո-կորիզների թեստ համակարգերի կիրառմամբ: Հաստատվել է գենետիկական էֆեկտների բարձր մակարդակ N1 և N5 հողային տարբերակներում համեմատած ստուգիչի և մյուս տարբերակների հետ: Հայտնաբերվել է ուղղակի կախվածություն կիրառված երկու թեստերի մարկերային չափանիշների հաճախականության միջև:

Ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ տրադեսկանցիան (02 կլոն) կարող է կիրառվել որպես հուսալի կենսաինդիկատոր տեխնածին տարածքներից վերցված հողերի գենետիկական մշտադիտարկման համար:

*Տրադեսկանցիա (02 կլոն) – գենետիկական էֆեկտներ –
հող-բույս համակարգ – հողի աղտոտում*

The genotoxicity level of soil samples from areas of Syunik Marz with application Trad-SH and Trad-MN bioassays of model test-object Tradescantia (clone 02) was investigated. The higher level of genetic effects on the both biotests data in the N1 and N5 soil variants was revealed as compared to the control and other studied samples. The positive correlation between marker criteria frequency of Trad-SN and Trad-MN tests was disclosed.

The obtained results show that Tradescantia (clone 02) test system can be applied as efficient bioindicator in genetic monitoring of technogenic territories soil pollution.

Tradescantia (clone 02) – genetic effects – soil-plant test system – soil pollution

Почва является наиболее чувствительным индикатором эколого-геохимической обстановки территорий, так как в ней пересекаются пути миграции многих химических элементов, в том числе и токсикантов. Мониторинг загрязнения почвы техногенных и природных территорий является важнейшей частью системы экотоксикологического тестирования состояния окружающей среды [1, 3]. Для оценки антропогенного и техногенного воздействия на природные территории весьма актуально использование высокоинформативных растительных тест-систем [7,8]. В системе генетического мониторинга традесканция (клон 02) используется как чувствительный биоиндикатор уровня генотоксичности и кластогенности загрязнителей воздушной, водной и почвенной среды. Данная тест-система применяется для оценки воздействия ксенобиотиков окружающей среды не только на соматические, но и на спорогенные клетки в период микроспорогенеза.

Целью настоящей работы явилась оценка уровня генотоксичности некоторых почвенных образцов с территории Сюникского марза (окрестности г.Капан и прилегающих территорий) с применением тест-системы волосков тычиночных нитей (тест Трад-ВТН) и микроядерного теста (тест Трад-МЯ) традесканции (клон 02).

Материал и методика. Материалом исследования служили почвенные образцы с территории Сюникского марза Армении, расположенной в окрестностях г.Капан. На изучаемой территории, где в основном преобладают горно-лесные, горно-коричневые вязко-торфяные почвы, находятся Капанские медные, медно-молибденовые и Шаумянские полиметаллические рудники. На этой территории находятся небольшие рудники известняка, базальта, каолинита и пласты залежей гипса и ангидрида [2].

В качестве объекта изучения в системе “почва-растение” использовали клон 02 традесканции, растения которого выращивались в вазонах с исследуемыми почвенными образцами в одинаковых условиях. Для проведения вегетационного эксперимента исследуемые образцы почвы были соответственно маркированы: N1 – Отвал-1, N2 – Отвал-2, N3 – Водохранилище, N4 – Пионерская дамба, N5 – район с.Шаумян, N6 – вблизи с. Зангелан (берег р. Вохчи), N7 – вблизи с. Цав (Шикахохский заповедник).

В качестве условно контрольных использовали почвенные образцы со стеллажей теплицы ЕГУ. Условно фоновыми служили образцы с территории Шикахохского заповедника. Был проведен химический анализ исследуемых проб почвы на содержание химических элементов и тяжелых металлов (Na, P, K, Ca, Mg, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Ag, Mo, Cd, Pb).

Для определения уровня генотоксичности исследуемых образцов почвы использовали тест-систему волосков тычиночных нитей традесканции (биотест Трад-ВТН), где в качестве маркерных тест-критериев учитывались изменения окраски клеток-волосков тычиночных нитей с голубых на розовые (рецессивные мутационные события (МС) – РМС), а также появление генетически неопределенных бесцветных МС – БМС. При тестировании также фиксировались морфологические изменения волосков – карликовые (невыжившие – НВ) и разветвленные (РВ). В каждом варианте было проанализировано 10–22 тыс. ВТН в зависимости от почвенного образца. Расчеты частоты мутационных событий проводили в среднем на 1000 волосков по общепринятой методике [5].

Для определения кластогенных эффектов с применением микроядерного теста учитывались два основных тест-критерия: частота образования микроядер и процент тетрад с микроядрами. В каждом варианте было просмотрено по 3000 тетрад. Рассчитывали процент микроядер на 100 тетрад по общепринятой методике [6].

Уровень накопления химических элементов в изучаемых почвенных образцах определяли методом сопоставления фактических валовых содержаний металлов с условно контрольным (или фоновым) содержанием. При этом рассчитываемый суммарный коэффициент концентрации (СПК) является количественным интегральным показателем общей техногенной нагрузки и уровня содержания тяжелых металлов (ТМ) и химических элементов в исследуемой почвенной среде, а также – одним из критериев техногенной аномальности изучаемой территории [4].

Для выявления уровня техногенного загрязнения исследуемых почвенных образцов были построены качественные геохимические ряды по всем изученным вариантам со средним содержанием в них исследуемых

химических элементов и тяжелых металлов путем нормирования элементов в изученных образцах по условно контрольному значению. При этом был рассчитан коэффициент техногенной концентрации ($K_c = C/C_k$, где C – содержание элемента в среде, C_k – условно контрольное содержание), а также суммарный показатель концентрации для каждого варианта – сумма нормированных по условному контролю содержаний химических элементов в исследуемой почвенной пробе.

Все полученные результаты обрабатывали статистически с использованием t -критерия Стьюдента и применением компьютерной программы Statgraphics 16.2 Centurion.

Результаты и обсуждение. Полученные результаты по учету соматических мутаций у традесканции на основании данных биотеста Трад-ВТН выявили достоверное повышение частоты как РМС, так и БМС во всех исследуемых вариантах по сравнению с условно контрольным вариантом. Максимальный выход РМС, превышающий контрольный уровень в 3 раза, наблюдался в почвенных образцах N1 и N5. Также был отмечен значительный уровень БМС в вариантах N1, N2 и N3, который превысил контроль в 2,5–7,5 раз соответственно (рис.1).

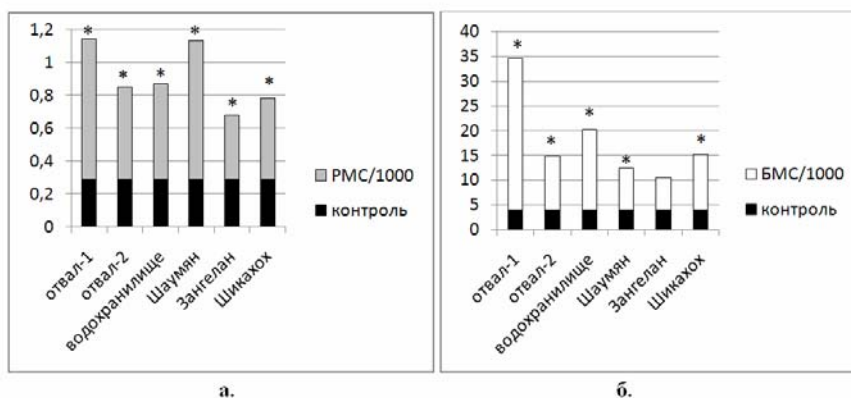


Рис. 1. Частота розовых (РМС)– (а) и бесцветных (БМС)– (б) мутационных событий в соматических клетках традесканции

Кроме этого, во всех исследуемых вариантах наблюдался высокий процент разветвленных и невыживших волосков, что свидетельствует о тератогенном действии находящихся в почвенных образцах элементов на традесканцию. Наибольший эффект, превышающий контроль в 2–2,5 раза, по данным морфологическим нарушениям, наблюдался в вариантах N5 и N6. Следует также отметить, что в начале вегетации растения образца N4 высохли, что может быть обусловлено соотношением в данной пробе токсичных для роста растения химических элементов.

Кроме того, в течение всей вегетации происходило подавление роста и цветения растений в варианте с образцом N2, где был определен наиболее высокий уровень СПК по сравнению с другими вариантами.

Изучение кластогенных эффектов на основании биотеста Трад-МЯ показало повышение частоты образования как МЯ в тетрадах, так и тетрад с МЯ во всех изученных почвенных пробах по сравнению с контролем. Максимальный уровень индукции был выявлен в образцах N1, N5 и N6, где значения обоих маркерных тест-критериев превысили уровень контроля в 2–2,5 раз в зависимости от варианта (рис. 2).

На основании построенных качественных геохимических рядов были выделены доминантные загрязнители в каждом почвенном образце, а также определена доля каждого химического элемента и ТМ в общей сумме загрязнения (табл. 1).

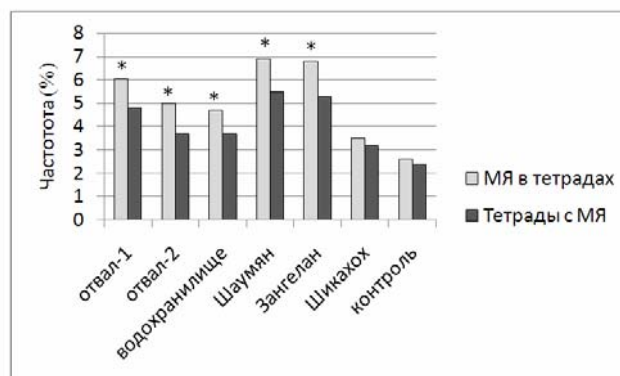


Рис. 2. Частота розовых микроядер (МЯ) в тетрадах и тетрад с МЯ в спорогенных клетках традесканции

Таблица 1. Геохимические ряды и суммарный показатель концентрации химических элементов в исследуемых почвенных образцах

Пробы почв	Геохимический ряд *	СПК
N1	Mo _(5,0) - Cu _(7,7) - Cd _(6,5) - Zn _(2,4) - Ag _(1,4) - Fe _(0,9) - K _(0,8) - Mn _(0,4) - Cr _(0,3) - Mg _(0,2) - Ca _(0,1)	47,1
N2	Cd _(30,0) - Zn _(28,0) - Mg _(18,2) - Cu _(12,2) - Ag _(8,0) - Ca _(4,9) - Fe _(3,7) - K _(2,9) - Mn _(2,7) - Mo _(2,0) - P _(1,0) - Cr _(0,4)	114,0
N3	Cu _(1,7) - Ca _(1,3) - Mo _(0,9) - Fe _(0,8) - Mn _(0,8) - Mg _(0,7) - K _(0,6) - Ag _(0,4) - Cr _(0,2)	9,8
N4	Cu _(20,5) - Cd _(16,6) - Ag _(8,0) - Zn _(6,7) - Mo _(2,0) - Fe _(1,6) - K _(0,8) - Mn _(0,5) - P _(0,4) - Cr _(0,3) - Mg _(0,2) - Ca _(0,1)	57,7
N5	Cd _(6,5) - Zn _(3,3) - Ca _(4,0) - P _(3,4) - Cu _(3,0) - Mo _(2,0) - K _(1,9) - Mg _(1,8) - Ag _(1,6) - Fe _(1,0) - Mn _(0,9) - Cr _(0,7)	32,1
N6	Mo _(20,0) - Cu _(11,7) - Cd _(2,6) - Zn _(2,1) - Ag _(2,0) - P _(1,9) - K _(1,6) - Fe _(1,3) - Cr _(0,3) - Mn _(0,1) - Ca _(0,1) - Mg _(0,04)	43,7
N7	P _(1,6) - Fe _(1,3) - Mg _(0,9) - Ag _(0,8) - Mn _(0,7) - Cd _(0,7) - Zn _(0,6) - Cr _(0,6) - Cu _(0,5)	9,8

*Примечание: в скобках приведено значение коэффициента техногенной концентрации по отношению к контролю

Был проведен корреляционный анализ между уровнем соматических мутаций (РМС), а также процентом МЯ и концентрациями химических элементов и тяжелых металлов в исследуемых почвенных образцах. На основании полученных данных выявлена положительная, но недостоверная корреляция между концентрациями Cu, Mo и P в почвенных образцах и обоими тест-критериями микроядерного теста (табл. 2).

Таблица 2. Коэффициенты корреляции между концентрациями химических элементов и значениями критериев микроядерного теста

Параметры Элементы	МЯ в тетрадах	Тетрады с МЯ
Медь (Cu)	0,55 ± 0,36	0,48 ± 0,40
Молибден (Mo)	0,56 ± 0,37	0,59 ± 0,36
Фосфор (P)	0,59 ± 0,35	0,70 ± 0,32

Проведенный корреляционный анализ между уровнями мутационных событий (РМС, БМС, НВ, РВ) и частотой обоих тест-критериев микроядерного теста показал наличие достоверной положительной связи между РМС и БМС ($r = 0,67$, при $p < 0,05$), а также – между РМС и частотой МЯ в тетрадах и тетрад с МЯ ($r = 0,61$ и $0,62$ соответственно, при $p < 0,05$). Кроме того, выявлена

положительная прямая зависимость между значениями НВ и РВ ($r = 0,82$, при $p < 0,01$), а также – между частотой МЯ в тетрадах и данными параметрами (для НВ – $r = 0,72$, при $p < 0,01$, а для РВ – $r = 0,70$, при $p < 0,01$).

Полученные нами данные по изучению генотоксичности исследуемых почвенных образцов с территории Сюникского марза с применением обоих биотестов показали увеличение как частоты РМС, так и МЯ в тетрадах во всех опытных вариантах по сравнению с контрольным уровнем в зависимости от пункта исследования. Наибольший выход генетических эффектов по данным обоих тестов проявился в вариантах N1 и N5, что свидетельствует о выраженной генотоксичности данных почвенных образцов. Кроме того, данными корреляционного анализа показана прямая зависимость между уровнем проявления маркерных критериев теста Трад-ВТН (РМС, НВ и РВ) и критериями Трад-МЯ теста.

На основании проведенных нами исследований показана целесообразность и возможность применения модельной системы традесканции (клон 02) для биоиндикации и генетического мониторинга состояния почвы техногенно нарушенных и природных территорий.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Водяницкий Ю.Н.* Экоотоксикологическая оценка опасности тяжелых металлов и металлоидов в почве. *Агрохимия*, 2, с. 75-84., 2012.
2. *Оганесян В.К.* Кафанские медные рудники. Ереван, 158с., 1973.
3. *Орлов Д.С., Малинина М.С., Мотузова Г.В.* Химическое загрязнение почв и их охрана, М., Агропромиздат, 303с., 1991.
4. *Перельман А.И., Касимов Н.С.* Геохимия ландшафта. М., Астрель, 768с., 1999.
5. *Ma T.H., Gabrera G.L., Cebulka-Wasilewska A., Chen R., Loarea E., Vanderberg A.L., Salamone M.F.* Tradescantia stamen hair mutation bioassay. *Mutat. Res.*, 310, p. 211-220, 1994a.
6. *Ma T.H., Gabrera G.L., Chen R., Gill B.S., Sandhu S.S., Vanderberg A.L., Salamone M.F.* Tradescantia Micronucleus Bioassay. *Mutat. Res.*, 310, p.220-230, 1994b.
7. *Cesniene T., Kleizaite V., Ursache R., Zvingila D., Radrevicius A., Patamsyte J., Rancelis V.* Soil-surface genotoxicity of military and urban territories in Lithuania, as revealed by Tradescantia bioassays. *Mutat. Res.*, 697, p.10-18, 2010.
8. *Steinkellner H., Mun-Sik K., Helma C., Echer S., Ma T.H., Horaka S., Kundi M., Knasmuller S.* Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. *Environ. Mol. Mutagen.* 31, 2, p.183-191, 1998.

Поступила 03.12.2015



Biolog. Journal of Armenia, 1 (68), 2015

GROWTH POSSIBILITY OF JAPANESE BASIL IN ORGANIC HYDROPONICS

S.KH. MAIRAPETYAN, A.H. TADEVOSYAN, A.Z. ASATRYAN

*G.S. Davtyan institute of hydroponics problems, NAS RA
hydrop@netsys.am*

As a result of preliminary research, the possibility of obtaining organic plant raw material in hydroponic conditions has been confirmed. It was found that among organic fertilizers added to volcanic slag and gravel mixture, application of manure was the most effective. And when using two doses of manure and guano, maximum yield of fresh leaves of Japanese basil and essential oil output was observed. Identical results were also obtained when the plants were nourished with two doses of manure, guano and biohumus. Under these conditions, the yield of the leaves exceeded the other variants 1.5-3.5 times, but was inferior to soil plants 1.9 times. Minimum essential oil content was observed in control variants and when nourishing the plants with only gunao.

Volcanic slag – gravel – manure – guano – biohumus – essential oil

Նախնական հետազոտությունների արդյունքում հաստատվել է օրգանական հիդրոպոնիկայի պայմաններում բուսահումքի ստացման հնարավորությունը: Պարզվել է, որ հրաբխային խարամի և գլաքարի խառնուրդին ավելացված օրգանական պարարտանյութերից արդյունավետ է եղել գոմաղբի կիրառումը, իսկ գոմաղբի և թռչնաղբի կրկնակի չափաքանակների կիրառման դեպքում դիտվել է ճապոնական ռեհանի թարմ տերևների առավելագույն բերքատվություն ու եթերայուղի ել: Նույնատիպ արդյունք է գրանցվել նաև գոմաղբի, թռչնաղբի և կենսահումուսի կրկնակի քանակներով բույսերը սնուցելիս: Այս դեպքում, տերևների բերքը գերազանցել է մյուս տարբերակներին 1.5-3.5 անգամ, սակայն զիջել է հողային բույսերին 1.9 անգամ: Միայն թռչնաղբով բույսերի սնուցման դեպքում և ստուգիչ տարբերակներում դիտվել է տերևներում եթերայուղի նվազագույն պարունակություն:

Հրաբխային խարամ – գլաքար – գոմաղբ – թռչնաղբ – կենսահումուս – եթերայուղ

В результате предварительных исследований установлена возможность получения растительного сырья в условиях органической гидропоники. Выяснилось, что из органических удобрений, добавленных в смесь вулканического шлака и гравия, эффективным было применение навоза. При использовании двойной дозы навоза и птичьего помета наблюдалась максимальная урожайность свежих листьев японского базилика и наибольший выход эфирного масла. Идентичный результат получен также при подпитывании растений двойными дозами навоза, птичьего помета и биогумуса. В этих условиях урожайность листьев превосходила другие варианты в 1.5-3.5 раз, но уступала почвенным растениям в 1.9 раз. При подпитке растений только птичьим пометом и в контрольных вариантах наблюдалось минимальное содержание эфирного масла.

Вулканический шлак – гравий – навоз – птичий помет – биогумус – эфирное масло

Organic agriculture is aimed at producing ecologically clean plant raw material, as well as improving and promoting agricultural production from environmental, social and economical viewpoint. Organic fertilizers such as manure, guano, compost, biohumus, ash, peat, as well as green fertilization are used instead of mineral fertilizers [1, 7, 10, 14].

In the countries of the European Union the priority is given to creating appropriate legal basis concerning organic agriculture. In December, 1999 a regulation (№2092/91) came into force by the European Commission according to which organic products grown in the territory of the EU must be labeled [1]. The regulation aims at providing fair competition both for consumers and farmers.

Economically developed countries such as the USA, Canada, Australia, Argentina, Italy and others are among the leaders in the field of organic agriculture. They are major producers of food obtained without chemicals. The number of both producers and consumers of organic food is increasing rapidly in the world. According to many consumer studies, people generally buy organic food because it is seen to be healthier and more natural than its non-organic equivalents. For example, a recent study by the NZ Vegetable Growers Federation (VegFed), found that nearly 40% of people who purchase organic food do so because they believe it is pesticide-free [4].

There are almost 13,000 certified organic farms in the United States with a sales value of over \$3.1 billion. In the northeastern United States, more than 3,200 farms are certified organic and have a sales value of over \$300 million [11]. In terms of organic sowing areas the first place in the unit weight of lands suitable for agriculture belongs to Liechtenstein – 26.4%, the second is Austria 11.6%, the third is Switzerland 10.0%, then Italy 8.0%, Finland 7.0% and Denmark 6.6% [1].

Organic hydroponics. The main advantage of soilless culture or hydroponics is that the plants are easily provided with all macro- and micro-elements, which they obtain from the soil. The worldwide market value of hydroponically produced food will show sustained strength with a 6.5% compound annual growth rate (CAGR) over the five-year forecast period 2013-2018, beating the IMF estimated growth forecast of 3.6% for 2014. Producer value will increase from \$17.7 billion to \$24.3 billion [9].

Hydroponics is an ideal growing method for producing culinary and medicinal herbs. Not only do hydroponic herbs grow faster, they have significantly more flavor and aroma than herbs grown in soil [3]. According to research performed at the University of Minnesota, it is a known fact that herbs grown hydroponically have 20-40% more aromatic oils than field grown. Therefore, a small hydroponic herb garden can provide a continuous harvest of gourmet-quality produce in a relatively small space [12].

Hydroponics has the opportunity to fill the gap between traditionally grown produce and organics. It's the alternative to traditional field cropping and uses IPM (Integrated Pest Management) to its maximum [6]. Unlike traditional hydroponics, organic fertilizers such as manure, guano, compost, biohumus, etc. are used in organic hydroponics.

Geoff Wilson reports there are 800 million people practicing urban agriculture, and that inorganic and organic hydroponic technologies can play an increasing role in feeding the world's poorest countries, as well as the mega cities: "In my view, future urban agriculture will be based on space-saving, water-efficient food production systems that use both inorganic and organic hydroponics" [15].

The objective of the work – cultivation peculiarities of common basil (*Basilicum sativum* L.) in soilless culture – are very well studied [5, 8]. Japanese basil (*Perilla frutescens* v. *crispa*) has been introduced to soilless culture recently. It is a herb of Japanese extraction and is commonly cultivated as a vegetable in Japan. The green leaves can be served as tempura, in salads and with sashimi. It is also ground and used to flavor sauces, added to ponzu (a soya sauce, dashi (fish stock) and daidai juice sauce), used in nabe (Japanese stews) and Japanese-style spaghetti dishes.

The leaves can be soaked in soya sauce for a year and wrapped around rice to make a tasty onigiri (Japanese rice ball), or chopped up, boiled in soya sauce and sugar and left to ferment to make tsukudani, which is eaten as a side-dish to accompany rice.

Taking into account the wide use of Japanese basil in food, our objective is to study the production possibility of this new culture in organic hydroponics, to reveal the optimal conditions for productivity, high yield and high quality of biomass for food.

Materials and methods. Seedlings grown by us with hydroponics method have been used as planting material which were planted in 0.25 m² hydroponics pots (fig. 1) with 20 plants/m² planting density. 3-15 mm diameter particles of volcanic slag and gravel mixture with 1:1 ratio have been used as a hydroponic substrate.

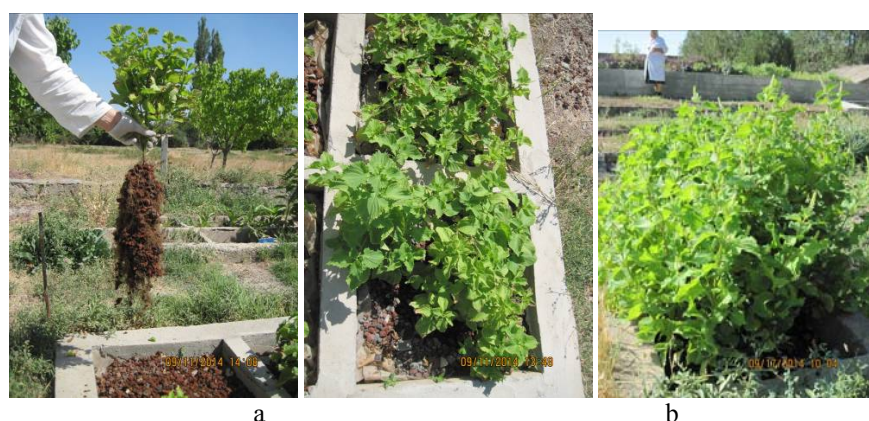


Fig.1. Japanese basil in organic hydroponics (a) and in soil (b)

Different quantity of manure, guano, biohumus was used in the experiments (1 dose of manure (M) – 800g, 1 dose of guano (G) – 75g, 1 dose of biohumus (B) – 300g). Water streaming (75 ml water/plant) was done 5-6 times a day. At the same time root and foliar feeding of plants was done. Root nutrition was done with Bio (Dunger Universal-Germany, 5ml /L water, 50ml nutrient solution was given to each plant) and AZC (Azocovit-1, Armenia, 5ml/L water, 50ml nutrient solution was given to each plant) and foliar feeding with BPF fertilizers (Bioplantflora, Russia, 2.5ml/L water). The frequency was once in 12 days for each fertilizer, with 4-day intervals.

The content of essential oil in dried leaves was determined with steam distillation method [2]. A statistical analysis of collected data was carried out using GraphPad5 software program.

Results and Discussion. The research results have shown that organic fertilizers have a significant influence on biomass accumulation of plants and biosynthesis intensity of essential oil in the leaves in case of separate or combined application (tabl. 1).

A minimum yield of Japanese basil leaves was observed when the plants were watered with only water and obtained foliar feeding, as well as in case of applying 1 or 2 doses of guano.

Gradual increase of manure dose promoted yield increase of the leaves. In case of 2 and 3 doses a relatively high yield of leaves was observed which exceeded control variants (C1 and C2) 2.0-2.3 times and guano variants (1G, 2G and 3G) 1.4-2.3 times. It should be noted that in case of applying 3 doses of only guano a significant difference of leaf yield was observed compared to control variants (C1 and C2).

In case of combined applying 2 doses of manure and guano (2M2G+FF) maximum yield of leaves was observed, which exceeded the control variants 3.1-3.4 times. Maximum yield was also obtained in case of combined use of manure, guano and biohumus 2 doses (2M2G2B+FF).

Table 1. Scheme of the experiments

№	Variants	№	Variants
1.	C1 – control 1 (only water)	8.	3G + FF – 3 doses of guano + foliar feeding
2.	C2 + FF – control 2 (only water + foliar feeding)	9.	1M1G+FF – 1 dose of manure + 1 dose of guano + foliar feeding
3.	1M + FF – 1 dose of manure + foliar feeding	10.	2M2G+FF – 2 doses of manure + 2 doses of guano + foliar feeding
4.	2M + FF – 2 doses of manure + foliar feeding	11.	1M1G1B+FF – 1 dose of manure + 1 dose of guano + 1 dose of biohumus + foliar feeding
5.	3M + FF – 3 doses of manure + foliar feeding	12.	2M2G2B+FF – 2 doses of manure + 2 doses of guano + 2 doses of biohumus + foliar feeding
6.	1G + FF – 1 dose of guano + foliar feeding	13.	S-soil
7.	2G + FF – 2 doses of guano + foliar feeding		

Maximum yield was also obtained in case of combined use of manure, guano and biohumus 2 doses (2M2G2B+FF). It should also be noted that adding 1 dose of biohumus to manure and guano (1M1G1B+FF) has considerably increased the leaf yield (1.6 times compare to 1M1G+FF), however, adding 2 doses of biohumus (2M2G2B+FF) was not essential compared to 2M2G+FF variant.

Table 2. Productivity of Japanese basil (fresh mass) in organic hydroponics and soil

№	Variants	Leaf, g/plant	Stem, g/plant	Root, g/plant	Above-ground mass, g/plant	□ plant, g/plant	Essential oil, □
1.	C1	23.0 ^a	12.1	13.4	35.1	48.5	0.6±0.03
2.	C2 + FF	21.3 ^a	16.1	20.1	37.4	57.5	0.83±0.05
3.	1M + FF	27.9 ^{ab}	17.1	16.4	45.0	61.4	0.69±0.04
4.	2M + FF	45.6 ^c	21.0	23.5	66.6	90.1	0.92±0.05
5.	3M + FF	48.6 ^c	22.0	21.2	70.6	91.8	1.0±0.05
6.	1G + FF	20.7 ^a	13.1	14.4	33.8	48.2	0.48±0.03
7.	2G + FF	24.6 ^a	12.5	20.3	37.1	57.4	0.58±0.04
8.	3G + FF	31.5 ^b	15.1	17.0	46.6	63.6	0.6±0.04
9.	1M1G + FF	28.4 ^{ab}	13.2	16.8	41.6	58.4	0.67±0.04
10.	2M2G + FF	72.0 ^d	37.1	29.6	109.1	138.7	0.83±0.04
11.	1M1G1B + FF	46.3 ^c	22.3	21.5	68.6	90.1	1.0±0.06
12.	2M2G2B + FF	72.1 ^d	27.6	19.1	99.7	118.8	0.88±0.05
13.	S	135.4 ^e	67.8	34.8	203.2	238	0.92±0.05

^{abcde}Tukey's Multiple Comparison Test (P<0.05)

As supposed the leaves of soil plants considerably exceeded all the tested organic hydroponics variants: 1.9 times the best variants (2M2G+FF and 2M2G2B+FF) and 2.8-6.5 times other variants.

It turned out that FF nutrition promoted only root system development which however didn't lead to leaf weight increase (C2+FF). In these variants, as well as in case of separate application of guano and manure 1 dose (1M+FF and 1G+FF) the least percentage share of leaves was observed in the whole plant and above-ground biomass (fig. 2 and 3).

Minimum content of roots was observed in the whole biomass of the plant in the best variants of organic hydroponics (2M2G+FF and 2M2G2B+FF) and in soil. The amount of active roots was probably high in these variants (fig. 2).

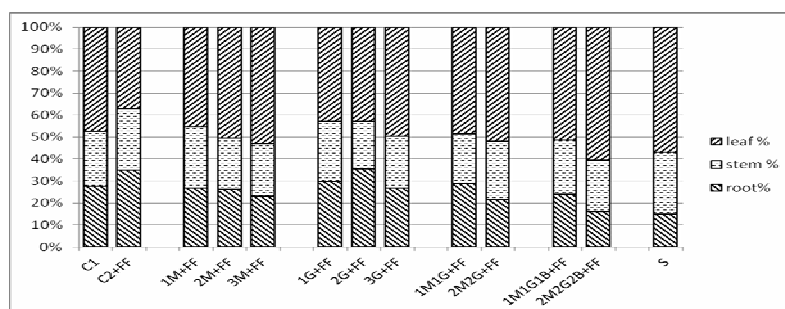


Fig.2. Ratio of leaves, stems and roots of Japanese basil in conditions of organic hydroponics, %

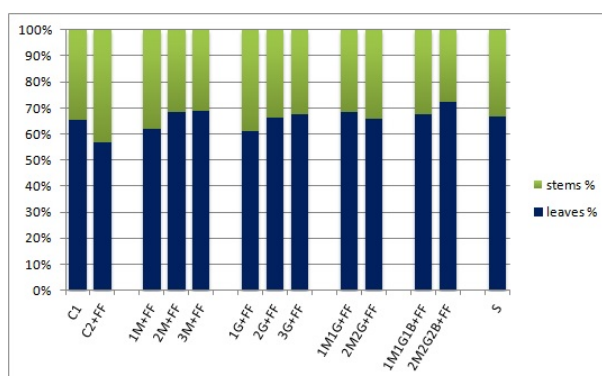


Fig.3. Ratio of stems and leaves of Japanese basil above ground mass, %

The results of biochemical analysis of the leaves have shown that a minimum content of essential oil in dry leaves was registered in the control and only in case of applying different doses of guano (1G+FF, 2G+FF and 3G+FF).

Plants nourished with 2 and 3 doses of manure as well as 2M2G+FF, 1M1G1B+FF and 2M2G2B+FF variants had maximum amount of essential oil in the leaves.

It turned out that essential oil biosynthesis was more intensive in plants nourished with manure. The essential oil content in the leaves of the variants which were nourished with only manure exceeded those nourished with only guano 1.4, 1.5 and 1.7 times. It also turned out that adding biohumus also promoted essential oil synthesis. Adding 1 dose of biohumus intensified biosynthesis of essential oil by about 40% and in case of 2 doses by more than 10%.

The same content of essential oil was observed in the leaves of the best variants of organic hydroponics 2M2G+FF and 2M2G2K+FF and soil plants.

Plants of control variants and plants nourished with only 1 and 2 doses of guano excelled with minimum essential oil output.

2M2G+FF and 2M2G2K+FF variants are notable for maximum output of essential oil, however they conceded soil plants about 2.3 times.

It should be noted for comparison that in classical hydroponics conditions (nourished twice a day with normal Davtayan's nutrient solution) the yield of Japanese basil fresh leaves was 270g/plant, with 8.5% essential oil content. Essential oil output was 377mg/plant [13]:

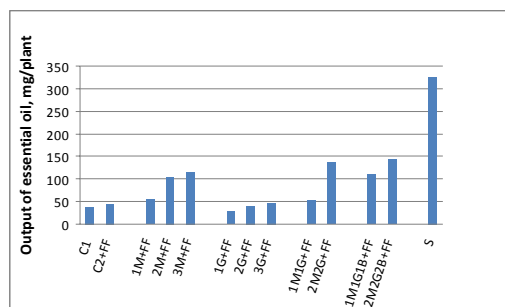


Fig.4. Essential oil output of Japanese basil in conditions of organic hydroponics, %

The results of preliminary investigations have shown that production of plant raw material in organic hydroponics is possible and can be very promising. In case of combined application of manure and guano, it is possible to grow biomass which is not inferior to soil plants with its quality.

REFERENCES

1. *Մարտիրոսյան Ն.Գ.* Օրգանական գյուղատնտեսություն, Երևան, հեղ. հրատ., 2005.
2. *Гинзберг А.С.* Упрощенный способ определения количества эфирного масла в эфирно-носах. Хим. фармацевт. пром-сть, 8-9, 326-329. 1932.
3. *Մայրապետյան Ս.Մ.* Կուլտուրա էփիրոմասլիկային բույսերի վերջին հիդրոպոնիկայի. ԱՊՀ, 1989.
4. *Carruthers S.* Battle of the tomato brands practical hydroponics and greenhouses, 72, p.5-7. 2003.
5. *Daryadar M.Kh.* The Productivity of *Ocimum Basilicum* L. in the Newest Experimental Modules of Water Stream Hydroponics. Journal of Applied Environmental and Biological Sciences. 4, 2, Text Road Publication, p. 284-288, 2014.
6. *Johnson P.* Nutrition & Hydroponics. Practical hydroponics and greenhouses, 55, p.18-21, 2000.
7. *Koller M., Koch R., Degen B.* Fertilization strategies in organic ornamental plants. Acta Hort., 1041, 47-52, 2014.
8. *Mairapetyan S.Kh., Daryadar M.Kh., Alexanyan J.S., Tadevosyan A.H., Tovmasyan A.H., Stepanyan B.T., Galstyan H.M.* Comparative description of productivity and content of biologically active substances of some essential oil-bearing plants in condition of new water stream hydroponics. Biolog. Journal of Armenia, 65, 3, p. 80-84, 2013.
9. Manifest Mind, LLC. <http://www.prnewswire.com/news-releases/growth-in-the-hydroponics-food-industry-set-to-outpace-global-markets-by-80-241264701.html>, 2014.
10. *Rom C.R., Garcia M.E., McAfee J., Friedrich H., Choi H.S., Johnson D.T., Popp J. Savin, M.* The effects of groundcover management and nutrient source during organic orchard establishment. Acta Hort., 873, 105-114, 2010.
11. *Sanchez E.S., Harper J.K., Kime L.F.* AGRICULTURAL ALTERNATIVES. Organic Vegetable Production. The Pennsylvania State University, Code UA391 09/14pod, 2014.
12. *Smith H.* Hydroponic Herb Production, Hydroponicseducation.Com, 2013.
13. *Tadevosyan A.H., Mairapetyan S.K., Tavakalyan N.B., Pyuskyulyan K.I., Hovsepyan A.H. Sergeeva S.N.* Regulation of transfer of ¹³⁷Cs by polymeric sorbents for grow ecologically sound biomass. International Science Index, 8, 3, p. 963-966, 2014.
14. *Willer H., Granatstein D., Kirby E.* The global extent and expansion of organic horticulture production. Acta Hort., 933, 23-34, 2012.
15. *Wilson G.* Mega cities of tomorrow. Practical hydroponics and greenhouses, 54, p. 46-47, 2000.

Received on 08.09.2015



Биол. журн. Армении, 1 (68), 2016

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКОРИЗНОГО ПРЕПАРАТА МИКОНЕТ КАК СТИМУЛЯТОРА РОСТА ДЛЯ РАЗНЫХ ВИДОВ ТЫКВЫ

К.Г. АЗАРЯН¹, Р.С. БАЛАЯН², Л.М. ТАДЕВОСЯН²

¹Ереванский государственный университет, кафедра микробиологии,
биотехнологии растений и микроорганизмов,
keti.azaryan@mail.ru

²Научный центр овощебахчевых и технических культур МСХ РА
lauratad@rambler.ru

Изучено влияние предпосевного замачивания семян в растворе индийского микоризного препарата Миконет на всхожесть, рост, развитие и урожайность тыквы. Установлена стимуляция всех процессов жизнедеятельности, особенно усиление роста опытных растений, ускорение созревания плодов и повышение урожайности. Повышение биохимических показателей свидетельствует об интенсификации метаболизма опытных растений.

Миконет – тыква – вегетация – плод – урожайность

Ուսումնասիրվել է հնդկական Միկոնետ միկորիզային պատրաստուկով դրմի սերմերի նախացանքային մշակման ազդեցությունը բույսերի աճման, զարգացման և բերքատվության վրա: Արձանագրվել է Միկոնետի խթանիչ ազդեցությունը բույսերի կենսագործունեության բոլոր գործընթացների և հատկապես բույսերի աճի և պտուղների հասունացման արագացման վրա: Ստացված արդյունքները վկայում են մշակված բույսերի նյութափոխանակության ուժեղացման մասին:

Միկոնետ – դրմի – վեգետացիա – պտուղ – բերքատվություն

The influence of pre-sowing soaking by solution of Indian Mykonet mycorrhizal preparation on seeds germination, plant growth, development and crop capacity of two kinds of pumpkin was studied. The stimulating effect of Mykonet on all life processes of plants, especially on plants growth and fruits maturation and enlargement, rise of yield was detected. The increase in the biochemical indices proves the metabolism intensification in the treated plants.

Mykonet – pumpkin – vegetation – fetus – yield

В современном растениеводстве расширяется применение препаратов, полученных на основе растений, грибов, микроорганизмов или их метаболитов. Основными преимуществами этих биопрепаратов являются их природное происхождение, быстрое разрушение в почве и экологическая безопасность для человека. В основе органического земледелия лежит использование только биопрепаратов, служащих стимуляторами роста, удобрениями и средствами защиты растений.

Сравнительно широко среди них уже используются и разрабатываются новые препараты на основе микоризных грибов, что обусловлено огромной ролью микоризы (симбиоза грибов и корней высших растений), которая жизненно необходима для нормального развития более чем 90% растений. Благодаря развитию микоризы, всасывающая поверхность корневой системы увеличивается в десятки раз, что значительно повышает устойчивость растений к неблагоприятным погодным условиям, нередким в наших условиях. Одновременно гифы грибов переводят недоступные для растений фосфаты в доступную форму как для опытных, так и для рядом растущих растений, оптимизируя минеральный состав почвы и повышая ее плодородие.

Среди микоризных биопрепаратов наиболее известны Микоплант (ФРГ), Мицефит (Россия), Трианум (Голландия) и сейчас в ряде стран успешно испытывается индийский препарат Миконет, производимый фирмой Elegant India. Первые 2 препарата на кафедре микробиологии и биотехнологии ЕГУ испытаны и проявили высокую эффективность [1, 5]. Миконет (Мн) любезно предоставлен кафедре производителем для его испытания в условиях Армении. Мн представляет собой хорошо растворимый в воде сухой черный порошок со спорами эндомикоризного гриба *Rhizophagus irregularis*, смешанного с древесным углем. Препарат сохраняет пригодность в течение 3 лет при хранении в сухом месте.

В связи с климатическими особенностями региона Мн может стимулировать рост и развитие растений путем усиленного развития корневой системы, а через неё и надземной части, что поможет перенести длительную жару в период созревания урожая даже в неблагоприятных погодных условиях.

Тыква – ценный и полезный продукт питания, известный человеку с древних времён. По содержанию углеводов, витаминов и минеральных солей тыква превосходит многие овощные культуры. Плоды её отличаются высокой диетической и питательной ценностью.

В Армении распространены три вида тыквы – крупноплодная, твердокорая и мускатная, отличающиеся размером, формой, окраской плода и сферой применения. Имеются также сорта с причудливыми формами, используемыми в декоративных целях.

Еще в средние века стало известно, что не менее, чем мякоть полезны и семена тыквы, содержащие в своем составе до 40% пищевого масла, в том числе таких жиров, как омега-3 и омега-6. Семена тыквы, как и других бахчевых культур, обладают большой сосущей силой и могут прорасти даже в довольно сухой почве. С развитием большой листовой поверхности потребность растений во влаге увеличивается, особенно в период массового цветения и образования плодов. Даже кратковременная засуха приводит к опаданию завязей и приостанавливает оплодотворение. Повышенная потребность растений тыквы во влаге определяет важность развития корневой системы, которая влияет на развитие надземной массы, цветение, завязывание и созревание плодов. Этим объясняется использование различных стимуляторов роста, особенно имеющих биологическое происхождение, при выращивании этой ценной культуры [4].

Целью проведенных исследований было изучение влияния предпосевного замачивания семян в течение 3 ч в растворе Мн (0,01%) на рост, биохимические показатели и урожайность 2 сортов тыквы: Беркануш и Арарати вардагуйн.

Материал и методика. Опыты проведены в 2014-2015 гг. на экспериментальном участке Научного центра овощебахчевых и технических культур МСХ Армении. Посев проведен двусторонне-ленточным способом по схеме 200+80/2х70 см. Образцы изучались по методике Государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур [2].

В течение вегетации проведены фенологические наблюдения, морфологические описания растений, биохимические анализы плодов, учет товарного и общего урожая.

При проведении химических анализов использовали общепринятые методики:

- сухие растворимые вещества определяли рефрактометром "ИРФ-454Б2М";

- сахара (общие) – по методу Бертрана;
- витамин С – по методу Мурри [3].

Агротехника возделывания была общепринятой для культуры тыквы в условиях Араратской равнины.

Результаты и обсуждение. Сорт Беркануш относится к мускатным тыквам и, благодаря высокому содержанию каротина, отличается оранжевым цветом мякоти, сладким вкусом и используется в основном для приготовления каш, сока и детских смесей. Сорт Арарати вардагуйн содержит меньше сахаров и каротина и благодаря плотной консистенции, плода используется для приготовления варенья.

Как видно из табл. 1, опытные растения по длительности фенотипов опережали контроль и раньше перешли к цветению и завязыванию плодов.

Таблица 1. Хозяйственная оценка тыквы

Варианты	Продолжительность периода, сут		Общий урожай, ц/га	Средняя масса плода, кг
	всходы-цветение	всходы-созревание		
АРАРАТИ ВАРДАГУЙН				
Контроль	35	110	425,0	6,0
Обработанные семена /Мн/	30	98	451,5	6,5
БЕРКАНУШ				
Контроль	40	115	390,0	4,7
Обработанные семена /Мн/	38	110	410,9	5,2

У тыквы сорта Арарати вардагуйн цветение началось на 5, а созревание плодов на 12 дней раньше контроля, т.е. растения проходили фенотипы в более сжатые сроки. У мускатного сорта Беркануш стимуляция всех процессов была выражена в несколько меньшей мере – те же показатели: начало цветения у опытных растений опередило контроль на 2 дня, созревание на 5 дней.

Наши исследования выявили влияние препарата Мн на массу, урожайность и качественные показатели плодов. Так, средняя масса плода у сорта Арарати вардагуйн на 0,5 кг, а общая урожайность на 26,5 ц/га или на 6,2% превысила контроль. Урожайность сорта Беркануш превысила контроль на 20,9 ц/га или на 5,3 %. По принятым в овощеводстве показателям наименьшая средняя разница (НСР) составила 9,5 ц/га, а относительный процент ошибки ($S_x\%$) – 1,3.

Нами отмечено воздействие препарата Мн на биохимический состав плодов. Как видно из рис.1, у сорта Арарати вардагуйн содержание сухого вещества, общего сахара и каротина превысило контроль. Однако у сорта Беркануш содержание сухого вещества и аскорбиновой кислоты было сравнительно занижено, а общий сахар и каротин превысили контроль соответственно на 0,5 % и 0,7 мг/% (рис.2). По содержанию аскорбиновой кислоты оба сорта несколько уступали контролю.

Погодные условия лета 2015 г. – длительная высокая температура – негативно отразились на развитии растений. В более благоприятных условиях для роста и созревания плодов стимуляция всех процессов была бы более ощутимой, как это наблюдалось в аналогичных опытах, проведенных в районах с более прохладным летом, например, в Мартуни.

В другом опыте, проведенном в этом районе, замачивание семян 2 сортов вьющейся фасоли в растворе Мн ускорило цветение и начало образования бобов, в которых завязывалось на 1-2 семени больше, причем по размеру семена опытных растений превосходили контрольные на 10-15%.

К.Г. АЗАРЯН, Р.С. БАЛАЯН, Л.М. ТАДЕВОСЯН

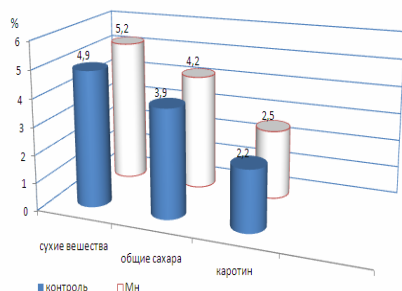


Рис. 1. Химический состав плодов сорта Арарати вардагуйн

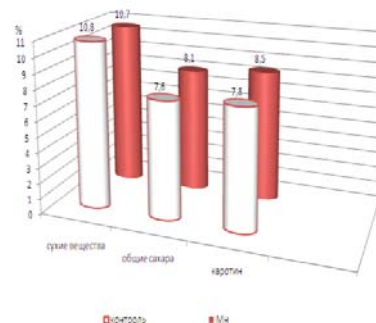


Рис. 2. Химический состав плодов сорта Беркануш



Миконет



контроль

Рис. 3. Плоды тыквы сорта Арарати вардагуйн

На рис. 3 грядка с опытными растениями для наглядности сфотографирована с большего расстояния, при этом заметно, что опытные плоды созрели и приобрели желтую окраску раньше контрольных.

Наши исследования показали, что применение препарата Миконет способствовало прохождению фенофаз развития растений в более сжатые сроки, увеличению урожайности и повышению качества плодов. Созревание плодов тыквы сорта Арарати вардагуйн началось на 12 сут раньше контроля, что в сочетании с большей массой плода позволяло с выгодой реализовать раньше созревшие плоды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азарян К.Г., Мелконян Э.А. Эффективность биопрепаратов при выращивании декоративных растений. Биолог. журн. Армении, 66, 4, с. 42-50, 2014.
2. Методика Государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. М., 1975.
3. Петербургский А.П. Практикум по агрономической химии. М., 1968
4. Фурса Т.Б. Филов А.И. Тыквенные. М., с.232, 1982.
5. Azaryan K.G., Popov Yu.G., Hovsepyan A.S., Avetisyan S.V. Perspectives of Natural Stimulators Application in Plant Cultivation. Proceedings of the Eurasian Symposium on Vegetables and Greens. Acta Horticulture, 1033, pp.65-75, 2014.

Поступила 20.10.2015



Biolog. Journal of Armenia, 1 (68), 2016

SYNTHESIS SODIUM, POTASSIUM SILICATES FOR THERMOREGULATING COATINGS SPACE VEHICLES BY MICROWAVE METHOD

V.V. BAGHRAMYAN¹, A.A. SARGSYAN², V.V. HARUTYUNYAN³

^{1,2} *Institute of General and Inorganic Chemistry of NAS of RA,*

³ *A.Alikhanyan National Laboratory (YerPhI)*

v_bagramyan@mail.ru

Systematic investigation of the possibility of using microwave (MW) energy for obtaining of silicates as pigments for the thermoregulating coating for the first time has been carried. Were obtained sodium and potassium silicate solutions different composition by hydrothermal microwave (HTN MW) treatment diatomite. Kinetic regularities were studied and were revealed the conditions obtaining of sodium and potassium silicates solutions using MW heating. The effect of various factors on the degree of SiO₂ recovery and the reaction rate was studied. The optimal conditions of HTMW processing of diatomite to produce silicate solutions with maximum reaction yield were determined. The behavior of sodium and potassium silicates after UV irradiation was investigated. The studies demonstrate the efficiency of microwave heating for obtaining of silicate solutions from silica-containing rocks. It has been established that microwave heating leads to an acceleration of the process and energy savings.

Diatomite – sodium and potassium silicates – hydrothermal microwave (HTN MW) treatment

Առաջին անգամ ուսումնասիրվել է միկրոալիքային (ՄԱ) էներգիայի օգտագործման հնարավորությունը ջերմակարգավորիչ ծածկույթների համար սիլիկատային պիգմենտներ ստանալու նպատակով: Ստացվել են տարբեր բաղադրության նատրիումի և կալիումի սիլիկատային լուծույթներ դիատոմիտների հիդրոջերմալիքային միկրոալիքային (ՀՋՄԱ) մշակման միջոցով: Ուսումնասիրվել են ՄԱ տաքացմամբ նատրիումի և կալիումի սիլիկատային լուծույթների ստացման կինետիկական օրինաչափությունները և որոշվել օպտիմալ պայմանները: Ուսումնասիրվել են տարբեր գործոնների ազդեցությունը SiO₂-ի կորզման աստիճանի և ռեակցիաների արագության վրա: Որոշվել են դիատոմիտի ՀՋՄԱ մշակման լավագույն պայմանները առավելագույն ելքով սիլիկատային լուծույթների ստացման համար: Հետազոտվել են նատրիումի և կալիումի սիլիկատների հատկությունները ՈւՄ ճառագայթումից հետո: Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել միկրոալիքային տաքացմամբ սիլիկատային ապարներից սիլիկատային լուծույթների ստացման արդյունավետությունը: Հաստատվել է, որ միկրոալիքային տաքացումը հանգեցնում է պրոցեսների արագացմանը և էներգիայի խնայողությանը:

*Դիատոմիտ – նատրիումի և կալիումի սիլիկատներ –
հիդրոջերմալիքային միկրոալիքային (ՀՋՄԱ) մշակում*

Впервые исследована возможность использования микроволновой (МВ) энергии с целью получения силикатных пигментов для терморегулирующих покрытий. Получены растворы силикатов натрия и калия различного состава гидротермально микроволновой (ГТМВ) обработкой диатомита.

Изучены кинетические закономерности и определены условия получения растворов силикатов натрия и калия с использованием МВ нагрева. Исследовано влияние различных факторов на степень извлечения SiO_2 и скорость реакции.

Определены оптимальные условия ГТМВ обработки диатомита для получения силикатных растворов с максимальным выходом. Изучены свойства силикатов натрия и калия после УФ облучения. Исследования показали эффективность микроволнового нагрева для получения силикатных растворов из кремнеземсодержащих пород. Установлено, что микроволновый нагрев приводит к ускорению и энергосбережению процессов.

Диатомит – силикаты натрия и калия – гидротермально микроволновая (ГТМВ) обработка

Thermoregulating coatings are used in space vehicles (SV) for the purpose of maintenance of their thermal regime. Nowadays it is provided with enamel and ceramic thermoregulating coverings of “solar reflectors” type on the basis of oxide pigments. Our analysis of scientific and technical information, experience and investigations in the field of synthesis of high-purity materials have shown that nanopowders of silicates of zirconium and zinc, doped with atoms of rare earth elements (REE) – yttrium, cerium, etc. – can be successfully used as pigments for solar reflectors [2-5, 10]. Preliminary studies indicated TRC on the basis of these materials will ensure their long-term operation in space. The use of silicate pigments for TRC is limited due to complicated technology of their obtaining. The stated materials are obtained on the basis of expensive high-purity chemical substances modified by nanopowders of definite compositions at high temperatures. The process of obtaining of nanocrystalline powders, as well as highpurity silicates of zirconium, zinc, etc. is multi-stage and prolonged, carried out at high temperatures. We have developed a hydrothermal-microwave (HTMW) method for the synthesis of nanocrystalline silicates that is more effective compared to solid phase or sol-gel methods. The aim of work is development of new compositions of thermoregulating coatings for space vehicles (SV) and new technology of their obtaining by original and perspective method – method of hydrothermal-microwave synthesis. Microwave heating provide contactless delivery of energy to the reacting fluids, high energy density possible, and short heating times in the range of minutes instead of hours. Microwave chemistry of obtaining silicate scarcely been studied. Developed method of obtaining of silicate by hydrothermal-microwave treatment is an effective method in comparison with the solid phase or zol-gel methods.

The first step is to develop a method of obtaining precursors from rocks for TRC. The essence of the method is the HTMW treatment of siliceous rocks by alkali solution to obtain sodium and potassium silicates. The developed method makes it possible to use siliceous rocks as a raw material for obtaining solutions of sodium and potassium silicates at low-temperature (90-200°C) for synthesis of silicates zinc and zirconium. In the mass industry traditional methods for production of sodium and potassium silicate solutions include a two step process: a) melting of silica rock and sodium/ potassium carbonate mixture at 1450-14700C in the glass furnace to obtain “silicate blocks”; b) dissolution in water of “silicate blocks” in rotating autoclaves at high pressure and temperature of 170-1800C for 5-6 hours [1, 6-9, 11]. Disadvantages of traditional methods of the production of alkaline silicate solutions are: high energy requirements, expensive and multistage production process and release of carbon dioxide and sulphuric anhydride to the atmosphere. One of the directions of intensification and improvement of ecological cleanness of the production of alkaline silicate solutions is the development of efficient methods for their production. This goal could be reached using a hydrothermal microwave approach which excludes high-temperature melting.

As a raw material were used diatomites from Armenian deposits. The sodium silicate solutions (with silica module 1) will be used to obtain silicates of zirconium, zinc and pigments on their basis. Potassium silicate solution (with silica module 3-4) will be used as a binder when forming TR coatings. There is not any information about rock use in production of silicate pigment. The analysis of references has shown that for production of pure silicates the use of rock is consider impossible because of the high content of coloring impurities. The patent-literary analysis shows that known methods of clearing silicates and their solutions from coloring impurities do not ensure necessary minimum content of iron compound, as these systems are difficult to clear. The obtaining of pure silicate materials by HT MW method synthesis of silicate pigments for TRC on the basis of rocks has not been described in the scientific literature. Meanwhile, our study on obtaining high-purity silicates testify to possibility of expansion of a raw-material base for production of pure silicates from natural siliceous rocks. Diatomite is chosen for obtaining different silicates.

Materials and methods. As a raw material for the production of solutions of alkali silicates some diatomites from Armenian deposits were used with the following content of basic components (in wt.%): SiO_2 – 84.24; Al_2O_3 – 3.65; TiO_2 – 0.31; CaO – 1.80; MgO – 1.05; $\text{Na}_2\text{O} + \text{K}_2\text{O}$ – 0.36; Fe_2O_3 – 1.75; loss at calcinations and moisture – 6.84 (moisture – 3.30). Externally, diatomites are loose or lightly compacted deposits of white, light gray, yellowish or pinkish floury and easily pulverized porous material. Diatomites are easy sedimentary rocks consisting mostly of amorphous silica in the form of microscopic (0.002-0.3 mm) frustules of diatomic algae. Bulk density of diatomites is 300-800 kg/m³, specific surface is 5-6 m²/g. X-ray analysis has shown that diatomites are mainly amorphous substances. To heat diatomites by microwave radiation, its dielectric properties should be determined. Dielectric parameters of diatomite (dielectric permeability $\epsilon' = 7.42$, $\text{tg}\delta = 0.525$) allow performing MW heating for chemical reactions. High silica content in diatomites and its amorphous structure enable to use diatomite for obtaining silicate solutions.

Synthesis of sodium and potassium silicates from ground diatomite (particle size < 1.0 mm) was performed in "Samsung" CE1073AR microwave oven in an open glass. Synthesis was carried out at a frequency of 2.45 GHz and microwave power of 900 W. In parallel, synthesis at similar ratios of the initial components was carried out in a thermostat at the boiling point of the solution and mechanical stirring. Heating time of the reaction mixture to boiling point at microwave treatment was 3-4 minutes at a power of 900 W.

The concentration of initial solutions of sodium hydroxide in terms of Na_2O made 40-150 g/l of Na_2O , and the ratio of moles of sodium oxide solution and silicon dioxide was 0.1-1.0. The weight ratio of the liquid (alkaline solution) and solid (rock) phases (L:S) was 4.0 to 6: 1.

Potassium silicate solution will be used as a binder when forming TR coatings. For this purpose it is necessary to have the potassium silicate solutions with silica module 3-4.

The concentration of initial potassium hydroxide solutions was 40-50 g/l of K_2O , and the ratio of moles of potassium oxide solution and silicon dioxide in the rock was 0.1-1.0; L: S = 4.0 - 6.5: 1. Heating time of the reaction mixture to boiling point at microwave treatment was 3-4 minutes at a power of 900 watts.

The process kinetics was controlled by changing the silicon dioxide concentration in the solution and precipitation depending on time, the initial amount of alkali and microwave power. The quantity of SiO_2 in the sodium/potassium silicate was determined by gravimetric method.

X-ray analysis the solid phase (after filtration and grinding below 20 μm) were registered using diffractometer "DRON-2" ($\text{CuK}\alpha$ radiation).

Figs. 1-4 show the kinetic curves of diatomite interaction with sodium/potassium hydroxide at hydrothermal and hydrothermal-microwave treatment when obtaining sodium/ potassium silicates. As it is seen from fig. 1, 2 when preparing sodium/potassium silicate solutions under identical conditions, the rate of MW processing of diatomite using alkali solutions is higher by a factor of 2 - 3 as compared with the conventional method of heating, where as the reaction yield is practically the same.

When preparing solutions of sodium metasilicate, SiO_2 yield is 90%, and when preparing potassium tetrasilicate – 80% of the rock silicon oxide.

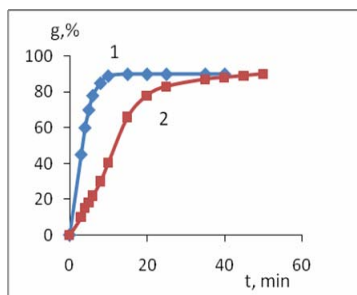


Fig.1. Degree of dissolved SiO_2 diatomite in obtaining $\text{Na}_2\text{O} \cdot \text{SiO}_2$ vs. the treatment time for: 1–MW-heating; 2– conventional heating.

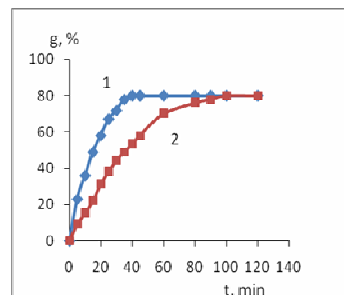


Fig.2. Degree of dissolved SiO_2 from diatomite in obtaining $\text{K}_2\text{O} \cdot 4\text{SiO}_2$ vs. the treatment time for: 1– MW-heating; 2 – conventional heating.

An important determinant of the properties and functional activity of a particular type of sodium/ potassium silicate is Silica Modulus, M , which indicates the ratio of SiO_2 and $\text{Na}_2\text{O}/\text{K}_2\text{O}$ moles. Maximum silica modulus of the potassium silicate reaches 4.0 and that of sodium silicate – 3.3.

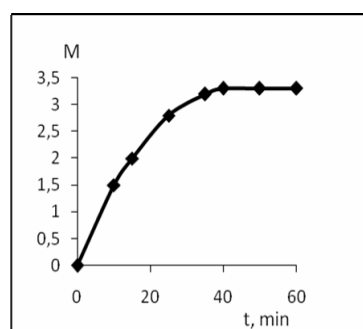


Fig.3. Silica Modulus, M ($\text{SiO}_2/\text{Na}_2\text{O}$) vs. the treatment time (t).

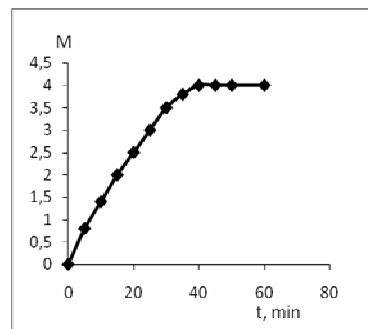


Fig.4. Silica Modulus M ($\text{SiO}_2/\text{K}_2\text{O}$) vs. treatment time (t)

The rate of the reactions producing silicate solutions depends on the type of alkali: treatment of rock by NaOH solution is faster than by KOH solution. On the basis of the obtained results, the following optimal conditions of HTMW processing of diatomite were determined to produce silicate solutions with maximum reaction yield. For obtaining sodium metasilicate: Na_2O concentration of 130 – 150 g/l, the ratio of liquid and solid phases (L:S) of 5.5 – 6.0, microwave oven power 900 W, $T=100^\circ\text{C}$, reaction time 15 min diatomite particle size less than 1 mm, reaction yield 90%.

When obtaining potassium liquid glass with modulus 4: K_2O concentration of 50 g/l, the ratio of liquid and solid phases (L:S) of 5.0, microwave power 900 W, $T=100^\circ\text{C}$, treatment time 40 min, diatomite particle size less than 1 mm, the reaction yield 80%.

The behavior of sodium and potassium silicates after UV irradiation was investigated: Some transmission spectra were measured in the wavelength range from 1 to 2.2 μm for the samples subjected to UV radiation. Before the irradiation, the potassium and sodium silicates obtained by HTMW treatment of diatomite were dried. UV irradiation was carried out using various exposures UV radiation cycles: 30 to 150 min. After UV radiation the measurements of transmission/absorption spectra were carried out. The sample, powdered test substance was mixed with KBr in the ratio of 30 to 130 mg. Then the mixture was milled and pressed in tablets 20 mm in diameter using a special molding tool. The measurements of transmission/absorption spectra were carried out at regular intervals after UV radiation.

Results and Discussion. Thus, for the first time systematic investigation of the possibility of using microwave energy to produce silicate solutions from diatomite was carried out. Kinetic regularities were studied and the conditions for obtaining solutions of sodium and potassium silicates using MW heating were revealed. The rate of the reactions producing silicate solutions depends on the type of alkali: treatment of rock by NaOH solution is faster than by KOH solution. This is due to the fact that sodium ion (ion radius Na^+ is 0.102 nm), in aqueous solutions is more active than potassium ion (ion radius. K^+ is 0.138 nm). The ionic strengths of solutions of these cations are different because of different ionic radii at the same charges. Experimentally, the rate of heating of the reaction mixture and the exposure time for obtaining silicate solutions of given compositions were determined. The optimum parameters of HTMW processing of diatomite were identified. It was found that the compositions of intermediate and target products of synthesis of sodium/potassium silicate solutions are identical regardless of the heating method – microwave or convective. It was revealed that the use of microwave energy can significantly intensify the process of hydrothermal treatment of diatomite compared with conventional heating methods.

The carried out experiments have shown the effectiveness of the microwave heating in the preparation of silicate solutions from silica-containing rocks – diatomite.

The transmission (absorption) spectra of sodium and potassium liquid glass obtained from diatomite show that the UV radiation contributes to a defect formation in the crystal lattice and, thus contributes to an increase of the resistance of materials with respect to radiation sources.

Acknowledgment. The work was supported by in frame of the ISTC Project A 2133.

REFERENCES

1. Ayler R. Chemistry of silica. Transl. from English, in 2 vol., M., Mir, 1106 pp., 1982.
2. Baghramyan V.V., Haroutunyan R.V., Sargsyan A.A., Meliksetyan A. M., Ghazaryan A.A., Petrosyan G.Kh, Leonelli C. Microwave synthesis of vanadium – zircon pigments. Armenian chemical bulletin, Yerevan, 66, 4, p. 578-587, 2013.
3. Baghramyan V.V., Sargsyan A.A., Ghazaryan A.A., Haroutunyan R.V., Petrosyan G.Kh. Meliksetyan A.M. Microwave synthesis and drying of zircon pigments' charges. Armenian chemical bulletin, Yerevan, 66, 2, p.244-251, 2013.
4. Baghramyan V.V., Sargsyan A.A., M.Meliksetyan A., Ghazaryan A.A., Leonelli, C. Microwave synthesis alkaline metals silicate solution. Armenian chemical bulletin, Yerevan, 66, 1, p.49-56, 2013.
5. Baghramyan V.V., Sargsyan A.A., Meliksetyan A. M., Ghazaryan A.A., Leonelli C. The influence of microwave treatment on the formation kinetics of alkalinesilicate solutions. 2nd Global Congress on Microwave Energy Applications, Kalifornia, Book of Abstracts, p. 98, 2012.
6. Joseph Pierr, Huhert Theunissen. Preparation of sodium silicate, Patent EP 0363197 A2, registered on 5th Oct. 1989.
7. John A., Kostinko. Preparation of sodium silicate solutions, Patent, US 4539191A, Registered 3rdSept. 1985.
8. Kitaygorodsky I. I. The technology of glass. Moscow, 621 pp., 1961.
9. Korneev V.I., Danilov V.V. Production and use of soluble glass. Liquid glass. L. Stroyizdat, LO, 176 pp., 1991.
10. Sargsyan A.A., Baghramyan V.V., Haroutunyan R.V., Leonelli C., "Hydrothermal-microwave synthesis of zircon". International Conference "Current problems of chemical physics", Epe-ван, 298 p., 2012.
11. Wells A.F. Structural Inorganic Chemistry 5th edition Oxford Science Publications ISBN 0- 9-855370-6. 1984.

Received on 18.01.2016



Биолог. журн. Армении, 1 (68), 2016

ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА ФРАКЦИИ NADPH ОКСИДАЗЫ ИЗ ИКРЫ РУЧЬЕВОЙ ФОРЕЛИ, КОРОВЬЕГО МОЛОКА И КУРИНОГО ЖЕЛТКА

¹Р.М. СИМОНЯН, ²С.М.ФЕСЧЯН, ¹Г.М.СИМОНЯН,
³Г.Р.ОКСУЗЯН, ¹М.А СИМОНЯН

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

²Государственный медицинский университет им. М.Гераци

³Государственный педагогический институт им. М.Налбандяна г.Гюмри
maxim.simonyan@gmail.com

Впервые с использованием явления нестабильного комплексообразования между гемоглобином и NADPH оксидазой, (Nox) локализованной в мембранных формированиях икры ручьевой форели, желтка куриных яиц и экзосом коровьего молока, выделены фракции изоформ Nox, расчетное удельное оптическое поглощение которых при 530 нм составляет 0,35, 0,15 и 0,24 оптических единиц (ое) соответственно. Изоформы Nox, выделенные из желтка, молока и икры, имеют повышенное содержание малонового диальдегида (фосфолипидных остатков): 10,8±1,3; 12,3±2,0 и 14,6±2,1 мМ/мг Nox, $p<0,05$, $n=6$ соответственно. Представленные Nox имеют характерные оптические спектры поглощения. Наблюдается прямо пропорциональная зависимость между содержанием фосфолипидных остатков и удельной NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активностью этих Nox. По сравнению с удельной O_2^- -продуцирующей активностью Nox из клеточных мембран млекопитающих, эта активность у Nox из икры, молока и желтка повышена в 3-4 раза. Эти биохимические показатели могут быть использованы для оценки качества пищевых продуктов, а также как новые и чувствительные диагностические тесты при заболеваниях дойных коров, рыб и кур.

NADPH оксидаза – молоко – яичный желток – икра рыбы

Առաջին անգամ օգտագործելով հեմոգլոբինի, լճակային Ֆորելի ձկնկիթի և հավի դեղնուցի թաղանթային կազմավորումներում և կաթի էկզոսոմներում տեղակայված ՆԱԴՓН օքսիդազի (Nox) հետ անկայուն կոմպլեքսագոյացման երևույթը անջատվել են Nox-ի իզոմերներ, որոնց հաշվարկային տեսակարար օպտիկական կլանումը 530 նմ-ում կազմում է համապատասխանաբար 0,35, 0,15 և 0,24 օպտիկական միավոր: Դեղնուցից, կաթից և ձկնկիթից անջատած այս Nox-երը ունեն մալոնային դիալդեհիդի (ֆոսֆոլիպիդային մնացորդների) բարձր պարունակություն, համապատասխանաբար 10,8±1,3; 12,3±2,0 և 14,6±2,1 մկՄ/մգ Nox-ում, $p<0,05$, $n=6$: Ներկայացված Nox-երը ունեն բնութագրական օպտիկական կլանման սպեկտրներ: Այս Nox-երի ֆոսֆոլիպիդային մնացորդների պարունակության և տեսակարար ՆԱԴՓН-կախյալ O_2^- -գոյացման ակտիվության միջև դիտվում է ուղիղ համեմատական կախվածություն: Կաթնասունների բջջաթաղանթների Nox-երի O_2^- -գոյացման ակտիվության համեմատ ձկնկիթի, կաթի և դեղնուցի Nox-երի ակտիվությունը ավելի է 3-4 անգամ: Այս կենսաքիմիական չափանիշները կարող են օգտագործվել որպես նշված սննդամթերքների որակի գնահատման նոր միջոց և որպես կովերի, ձկների ու հավերի հիվանդությունների բացահայտման զգայուն ախտորոշիչ թեստեր:

ՆԱԴՓН օքսիդազ – կաթ – ձվի դեղնուց – ձկնկիթ

For the first time, the fraction of isoforms of Nox were isolated by using the phenomenon of the formation of nonstable complex between hemoglobin and Nox, localized in the membran formations of the trout fish roe, hens egg yolk and exosomes of the milk. Their calculated specific optical absorptions at 530 nm were 0,35, 0,15 and 0,24, respectively. The isoforms of Nox from egg yolk, milk and caviar has increased content of malonic dialdehyde (residues of phospholipids): $10,8 \pm 1,3$; $12,3 \pm 2,0$ and $14,6 \pm 2,1$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ Nox, $p < 0,05$, $n=6$, correspondingly. These Nox has specific optical absorption spectra. The straight proportional dependence between content of the phospholipid residues and the specific O_2^- -producing activity of these Nox is observed. In comparison with the specific O_2^- -producing activity of the Nox from cell membranes of the mammals, the activity of the Nox from caviar, milk and egg yolk increases to 3-4 times. These biochemical indices can be used for evaluation of the quality of these food products, and as new and sensitive diagnostic tests for the diseases of dairy cows, fish and hens.

NADPH oxidase – milk – egg yolk – fish caviar

В настоящее время литературные данные о наличии NADPH оксидазной активности в икре рыб, желтке куриного яйца и коровьем молоке отсутствуют. С другой стороны, из молока коровы методом ультрацентрифугирования [6, 10] выделены экзосомы размером 40-100 нм. Экзосомы являются наночастицами, секретируемыми клетками. Они локализованы в биологических жидкостях и обеспечивают нормальное функционирование экстрацеллюлярной иммунной системы [9]. Экзосомы локализованы в сыворотке крови, жидкостях асцитных карцином и содержат изоформы экстрацеллюлярной NADPH оксидазы (eNox) [8]. Целью работы являлось выделение фракции изоформ Nox из экзосом молока коров, желтков куриных яиц, рыбьей икры и определение их свойств.

Материал и методика. *Выделение фракции Nox из икры форели.* Представленная ранее [10] процедура выделения Nox из икры несколько видоизменена. После гомогенизации икры (10 г) в воде (1:20 об/об) при 4°C в течение 3-х мин к нему добавляется гемоглобин (ферригемоглобин или феррогемоглобин – 50 μM , выделенный и очищенный из эритроцитов донорской крови) при pH 7,4-8. После инкубации этой смеси при 37° С в течение 2-х ч ее разбавляли в 25-30 раз и после инкубации в течение 20-25 мин при 4°C и центрифугирования при 5000 g супернатант подвергали ионообменной хроматографии на колонке с целлюлозой DE-52. Фракцию Nox элюировали 0,1 М калий фосфатным буфером pH 7,4 (КФБ).

Выделение фракции Nox из коровьего молока.

Выделение Nox из свежего коровьего молока (50 мл) включает те же процедуры, которые применялись при выделении Nox из икры с той разницей, что из колонки DE-52 Nox элюировали сначала 0,1 М КФБ, далее после разбавления элюата водой в 30 раз проводили ионообменную хроматографию на колонке DE-52. Фракцию Nox элюировали 0,04 М КФБ.

Выделение фракции Nox из желтков куриных яиц.

Выделение Nox из 2-х желтков (35-40 г) включает те же процедуры, которые применялись при выделении Nox из икры рыбы. Элюация Nox проводилась 0,1 М КФБ.

Определение NADPH-зависимой супероксид-продуцирующей активности фракции изоформ Nox. Активность определяли нитротетразолиевым синим (НТС) методом [4]. Удельная O_2^- -продуцирующая активность была определена в расчете на 1 мл фракции Nox, полученной из 1 мл молока, 1 г желтка или 1 г икры рыбы.

Определение удельного содержания фракции изоформ Nox.

Расчетное удельное содержание (плотность максимального оптического поглощения при 530 нм, β -полоса поглощения) изоформ Nox было определено в расчете на 1 мл Nox, выделенной из 1 мл молока, 1 г икры и 1 г желтка.

Определение содержания малонового диальдегида (МДА) в составе Nox.

Аскорбатзависимое перекисное окисление липидов (содержание малонового диальдегида в μM Nox) определяли оптическим спектральным методом, принимая молярную экс-тинкцию для МДА $-1,56 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [1].

Определение молекулярных масс изоформ Nox. Молекулярные массы изоформ Nox приведенных источников определяли методом гель-фильтрации на сефадексе G-100 (Pharmacia, Швеция), используя в качестве стандарта цитохром С из сердца быка, церулоплазмин и трансферрин из плацентарной крови женщин и каталазу из легких быка.

В ходе получения Nox использовалась центрифуга К-70 (Германия). Оптические спектральные измерения проводили на спектрофотометре "Spercord UV/VIS" (Германия) с длиной оптического пробега – 1 см. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли общепринятыми методами вариационной статистики.

Результаты и обсуждение. Небольшие видоизменения способа получения Nox [2] были осуществлены для удаления водонерастворимых липидсодержащих смесей, препятствующих проведению ионообменной хроматографии. Из колонки с целлюлозой DE-52 были элюированы белковые фракции, которые имели оптические спектральные показатели, характерные для изоформ Nox из мембран клеток, а также внутриклеточных и внеклеточных компонентов млекопитающих [8]. Указанные фракции в окисленном состоянии имеют форму оптических спектров и максимумы поглощения при 560 нм, 530 нм, 412 нм и 360 нм, а в восстановленном дитионитом натрия состоянии – при 558 нм, 525 нм, 418 нм и 365 нм (рис.1). После повторной ионообменной хроматографии на целлюлозе CM-52 и DE-52 форма оптических спектров поглощения изоформ Nox не изменяется. В результате гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-100 в случае Nox из икры и яиц выявлены две субъединицы с молекулярной массой около 22 и 91 кДа (это характерно для мембранных Nox [4]) и только в случае Nox из молока – одна субъединица с молекулярной массой до 75 кДа, что характерно для eNox из экзосом сыворотки крови млекопитающих или из экзосом жидкости асцитной карциномы различного характера [8]. После гель-фильтрации форма оптических спектров поглощения субъединиц изоформ Nox ощутимых изменений не претерпевает.

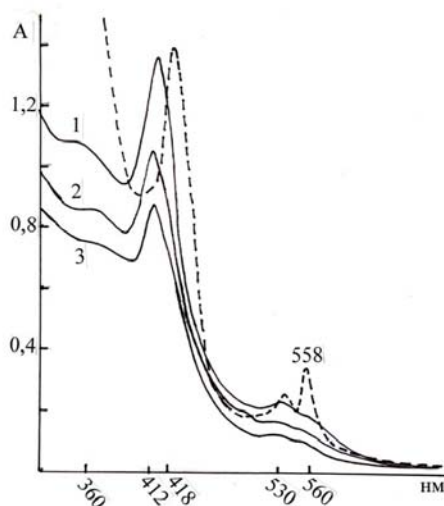


Рис. 1. Оптические спектры поглощения фракции изоформ Nox, выделенных из икры форели, выращенной в водоемах Армении (1); из свежего коровьего молока (2) и из желтков куриных яиц (3) после повторной хроматографии этих Nox на целлюлозе CM-52 и DE-52. После восстановления (1) дитионитом натрия появляется характерная форма и максимумов поглощения для Nox (цитохрома b_{558}) при 558 нм (----).

Если фракции Nox из икры рыбы и желтков куриных яиц из колонки с целлюлозой DE-52 элюируются 0,1 М КФБ, то фракция Nox из молока элюируется 0,04 М КФБ, что характерно для экстрацеллюлярной Nox (eNox), у которой, наряду с другими, имеется небольшое, но характерное для eNox поглощение при 485 нм [8]. Полученные данные свидетельствуют о том, что из икры и желтка получены фракции Nox, характерные для мембранных Nox, а из экзосом молока выделена eNox (рис.1). Однако плотность максимального оптического поглощения при 360 нм у полученных Nox (это свойственно для ФАД) из желтков яиц, икры и молока по сравнению с показателями Nox из других источников существенно повышена (в среднем до 2-2,5 раза). С другой стороны, количество фосфолипидных остатков в составе молекулы этих Nox, соответственно и уровень продукта аскорбат зависимой липидной перекисидации – малонового диальдегида (МДА), по сравнению с показателями Nox, выделенной из клеточных мембран, значительно выше (3-5 раз) [6]. Расчетное удельное содержание (расчетная плотность оптического поглощения при 530 нм) выделенных из икры Nox составляет 0,35 ое, из молока коровы – 0,24 ое, а из желтков куриных яиц – 0,15 ое. Интересно и то обстоятельство, что удельная NADPH-зависимая O_2^- -продуцирующая активность Nox из икры форели, из молока и куриных яиц составляет 62,5 ед/мл, 48,4 ед/г и 39,3 ед/г соответственно. Наблюдается прямопропорциональная зависимость между содержанием фосфолипидов в составе молекул этих Nox с их O_2^- -продуцирующей активностью. Эта активность в 3-4 раза превышает O_2^- -продуцирующую активность изоформ Nox из мембран клеток тканей млекопитающих (табл.1).

Таблица 1. Биохимические показатели фракции изоформ Nox из желтков куриных яиц, из коровьего молока и икры форели, n=6, p<0,05

Показатели изоформ Nox	1*	2	3
Расчетное удельное оптическое поглощение (A_{530})	0,15±0,03 (p=,005)	0,24±0,02 (p=,001)	0,35±0,04 (p=,003)
Расчетная удельная NADPH-зависимая O_2^- -продуц. активн. ед/мл.	39,3±4,1 (p=,003)	48,4±0,4,9 (p=,01)	62,5±7,1 (p=,003)
Расчетное удельное оптическое поглощение при 360 нм	1,04±0,1 (p=,005)	1,15±0,3 (p=,01)	1,37±0,4 (p=,001)
МДА μ М/мл Nox	10,8±1,3 (p=,003)	12,3±2,0 (p=,002)	14,6±2,1 (p=,003)

*Примечание: Nox из желтков куриных яиц (1), из коровьего молока (2), из икры форели (3).

Такое увеличение O_2^- -продуцирующей активности Nox из приведенных пищевых продуктов с одной стороны, может быть связано с повышенным содержанием ФАД в составе этих ферментов (плотность оптического поглощения при 360 нм). С другой стороны, увеличение уровня эндогенных фосфолипидных остатков в составе молекул приведенных Nox может быть фактором повышения этой активности (известно, что NADPH зависимая O_2^- -продуцирующая активность Nox повышается под воздействием экзогенных фосфолипидов) [4, 5, 9].

Таким образом, впервые с использованием явления нестабильного комплексообразования между гемоглобином и локализованной в мембранных формированиях икры форели и желтков куриных яиц выделены изоформы Nox, а из экзосом молока коровы – eNox. Одновременно с увеличением содержания ФАД и фосфолипидных остатков в составе молекул этих ферментов наблюдается резкое повышение NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности этих Nox.

Эти биохимические показатели могут быть применены для оценки качеств приведенных пищевых продуктов, а также как новые и чувствительные диагностические тесты при заболеваниях дойных коров, а также рыб и кур.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* Методы определения перекисного окисления липидов биологических мембран. М., "Наука", 252 с., 1972.
2. *Симонян Р.М., Симомян Г.М., Симонян М.А.* Способ выделения изоформ NADPH оксидазы (Nox) из биосистем. Лицензия изобретения агенства индивидуальной собственности РА N2818 А, Ереван, 2014.
3. *Симонян Р.М., Симомян Л.А., Ширинян С.В., Алексанян А.С., Симонян Г.М., Бабаян М.А., Алексанян С.С., Оганисян Г.А., Симонян М.А.* Новые биохимические показатели определения эффективности лечения злокачественного новообразования. *Вопр.теорет.клин.мед.*, 18, 2, 3-6, 2015.
4. *Brandes R.P., Weissmann N., Schröder K.* Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med.* 76, 208-226, 2014.
5. *Meijles D.N., Fan L.M., Howlin B.J., Li J.M.* Molecular insights of p47phox phosphorylation dynamics in the regulation of NADPH oxidase activation and superoxide production. *J. Biol Chem.*, 289, 33, 22759-22770, 2014.
6. *Reinhardt T.A., Lippolis J.D., Nonnecke B.J., Sacco R.E.J.* Bovine milk exosome proteome. *Proteomics*, 75, 5, 1486-1492, 2012.
7. *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.
8. *Simonyan R.M., Chailyan G.S., Shrinian S.V., Simonyan G.M., Alexanyan S.S., Simonyan M.A.* Inadequate changes of the level and activity of extracellular NADPH oxidase, isolated from fluid's nanoparticles of ascitic human lung carcinoma depending on the duration of the disease. In *intern simp. NANO Moscau*, Jule 13-18. P.144, 2014.
9. *Streeter J., Schickling B.M., Jiang S., Stanic B., Thiel W.H., Gakhar L, Houtman J.C., Miller F.J.* Phosphorylation of Nox1 regulates association with Nox A1 activation domain. *Circ Res.*, 115, 11, 911-918, 2014.
10. *Yamada T., Inoshima Y, Matsuda T, Ishiguro N.* Comparison of methods for isolating exosomes from bovine milk. *J. Vet Med Sci.* 74, 11, 1523-1525, 2012.

Поступила 13.10.2015



Biolog. Journal of Armenia, 1 (68), 2016

STUDY OF L-TYROSINE AND PYRIDINE CARBOXYALDEHYDES DERIVED SCHIFF BASE COPPER COMPLEXES AS POTENTIAL RADIOPROTECTIVE AGENTS

M.H. MALAKYAN, S.A. BAJINYAN, D.E. YEGHIAZARYAN

*Scientific Centre of Radiation Medicine and Burns
ritamalakyan@email.com*

Radioprotective properties of copper complexes with Schiff Bases derived from L-Tyrosine aromatic amino acid and 2-, 3-, or 4-pyridinecarboxaldehydes (Cu.2-Tyr, Cu.3-Tyr, and Cu.4-Tyr) were investigated in rats subcutaneously or orally treated with metallocomplexes at 10 or 40 mg/kg doses 1 or 24 hours before X-ray irradiation at 650 R that composes LD50/30 for untreated control irradiated animals. According to the study results, at all the applied schemes of animals preventive treatment Cu.2-Tyr failed to manifest radioprotection. However, Cu.3-Tyr and Cu.4-Tyr demonstrated expressed radioprotective activity that might be mainly related to their respective support of endogenous non-enzymatic antioxidant defence system of the organism.

It is concluded that the position of carboxaldehyde group with regard to nitrogen of pyridine ring, viz. 3 or 4, is of great importance for manifestation of radioprotective activity of Schiff Base copper complexes derived from pyridinecarboxaldehydes and L-Tyrosine.

*Ionizing radiation – copper – complex – L-Tyrosine – pyridinecarboxaldehyde –
radioprotection – antioxidant*

Առնետների վրա կատարված փորձերում հետազոտվել են L-թիրոզին ամինաթթվի և 2-, 3- և 4-պիրիդինկարբոքսալդեհիդների ածանցյալ Շիֆֆի հիմքերի հետ Cu(II) կոմպլեքսների (Cu.2-Tyr, Cu.3-Tyr, և Cu.4-Tyr) ճառագայթապաշտպանիչ հատկությունները: Մետաղական կոմպլեքսները ներմուծվել են օրգանիզմ ենթամաշկային կամ օրալ 10 կամ 40 մգ/կգ դոզաչափով 1 կամ 24 ժ 650Ռ դոզայով ճառագայթահարումից առաջ, ինչը կազմում է ՄԴ50/30, այսինքն՝ այն դոզան, որը 30 օրվա ընթացքում բերում է ստուգիչ խմբի կենդանիների 50%-ոց մահացությանը: Համաձայն ստացված արդյունքների՝ նախնական ներմուծման բոլոր կիրառված սխեմաների դեպքում Cu.2-Tyr-ը չի դրսևորել ճառագայթապաշտպանիչ ազդեցություն: Սակայն Cu.3-Tyr-ը և Cu.4-Tyr-ը ցուցաբերել են արտահայտված ճառագայթապաշտպանիչ ակտիվություն, որը կարող է կապված լինել օրգանիզմի բնածին՝ ոչ ֆերմենտային հակաօքսիդանտային պաշտպանության համակարգի համապատասխան մակարդակը պահպանելու նրանց ունակության հետ:

Ելնելով ստացված տվյալներից, կարելի է եզրակացնել, որ L-թիրոզինի և 2-, 3- և 4-պիրիդինկարբոքսալդեհիդների ածանցյալ Շիֆֆի հիմքերի հետ պղնձի կոմպլեքսների ճառագայթապաշտպանիչ ակտիվության դրսևորման համար կարևոր նշանակություն ունի կարբոքսալդեհիդային խմբի տեղակայումը, այն է՝ պիրիդինային օղակի ազոտի նկատմամբ 3 և 4 դիրքերը:

*Իոնացնող ճառագայթում – պղնձ, կոմպլեքս – L-թիրոզին – պիրիդինկարբոքսալդեհիդ –
ճառագայթապաշտպանիչ – հակաօքսիդանտ*

В опытах на крысах были исследованы радиопротекторные свойства комплексов меди с Шиффовыми основаниями, производными ароматической аминокислоты L-тирозина и 2-, 3-, или 4-пиридинкарбоксальдегидов (Cu.2-Tyr, Cu.3-Tyr и Cu.4-Tyr). Металлокомплексы вводили в организм подкожно или перорально в дозах 10 и 40 мг/кг за 1 ч или 24 ч перед рентгеновским облучением в дозе 650 Р, что составляет ЛД50/30 для контрольно облу-

ченных нелеченых животных. Согласно результатам исследования, при всех примененных схемах превентивного введения Cu.2-Тур не оказывал радиозащитного действия. Однако Cu.3-Тур и Cu.4-Тур проявляли выраженную радиопротекторную активность, что может быть связано с их способностью поддерживать соответствующий уровень эндогенной системы неферментативной антиоксидантной защиты организма.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что важное значение в проявлении радиозащитной активности комплексов меди с Шиффовыми основаниями, производными L-тирозина и 2-, 3-, или 4-пиридинкарбоксальдегидов, имеет расположение карбоксальдегидной группы, а именно 3 и 4, относительно азота пиридинового кольца.

Ионизирующая радиация – медь, комплекс – L-тирозин – пиридинкарбоксальдегид – радиозащита – антиоксидант

The increased use of ionizing radiation in various aspects of human life has necessitated development of effective and non-toxic radioprotectors against harmful effects of radiation exposures. Despite the substantial amount of research aimed at development of radioprotectors, there is still a need in reliable and efficient radioprotectors. Experimental findings demonstrate that prophylactic treatment with essential metalloelement chelate complexes provides radioprotection and facilitates tissue repair processes required for recovery from radiation injury [7, 8].

Many small molecular mass Cu organic complexes have been reported as SOD-mimetics enabling them to prevent accumulation of toxic metabolic products, promote biochemical, cellular and tissue repair processes required for recovery from radiation injury [1, 2].

Apart from the metal ion, the biologically relevant ligands coordinated to metal also predetermine the biological activity of metallocomplex [4, 5]. Schiff bases, the condensation products of primary amines and aldehydes, have high chelating ability and therefore are an important class of ligands. Because aromatic aldehydes and aromatic amino acids play an significant role in chemical and biological recognition [3, 10], their Schiff base derivatives are interesting for use as ligands. Pyridinecarboxaldehyde isomers bearing the carboxaldehyde group at 2-, 3- or 4-position with regard to nitrogen of pyridine ring are useful precursors for complex forming Schiff bases, because they might have similar physiological effect with pyridoxal-amino acid systems, which are significant in many metabolic reactions intermediated with amino acid and pyridoxal.

In this study the radioprotective properties of copper complexes with Schiff Bases derived from L-Tyrosine aromatic amino acid and isomeric 2-, 3-, or 4-pyridinecarboxaldehydes (Cu.2-Tyr, Cu.3-Tyr, and Cu.4-Tyr) were investigated, and the role of aldehyde group location in pyridine ring in the aspect of manifestation of radioprotection was ascertained.

Materials and methods. 1. Experimental design. Albino Wistar rats weighing 180-200 g were used in the study. RUM-17 roentgen facility was applied for animal radiation exposure in 2 experimental sets. In the 1st set of experiments, animals were subcutaneously or orally treated with tested copper complexes at 10 or 40 mg/kg doses 1 or 24 hours before X-ray irradiation at 650 R that composed LD_{50/30} for untreated control irradiated rats, i.e. the specified dose level was lethal for 50% control animals by Day 30 post irradiation. The radiomodifying effects of the substances were evaluated on the base of animal survival and their average life-span (ALS) in 30 days after irradiation.

The 2nd set of experiments was designed to reveal some biological effects of the titled copper organic complexes that might be responsible for their radioprotective properties. With this aim animals were subcutaneously administered 10 mg/kg of the copper complexes 1 hour before irradiation at 500R dose. On days 3, 7, 14 and 28 after exposure the intensity of lipid peroxidation (LPO) processes in blood plasma and the integral antioxidant activity (AOA) of endogenous non-enzymatic water-soluble low molecular antioxidants (NEWSLMAO) were analyzed.

2. Blood plasma LPO activity was measured based on determination of malone dialdehyde (MDA) content [11]. Briefly, the mixture of 0.1 ml blood plasma with 2.5 ml of 20% trichloroacetic acid solution and 1 ml of 0.68% solution of sodium thiobarbiturate was placed in a boiling water bath for 30 min. After cooling and adding 4 ml of butanol the mixture was shaken for 30 min and then centrifuged at 3000 rpm. MDA content was determined spectrophotometrically on UNICO 2100 UV-VIS spectrophotometer using its molar extinction coefficient: $\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ moles}^{-1}\text{cm}^{-1}$. The results were expressed as nanomoles MDA per 1 ml of blood plasma.

3. The integral AOA of NEWSLMAO was analyzed using photochemiluminescent analyzer PHOTOCHEM and the ACW kit (Analytik Jena, Germany). The method is based on determination of the degree of inhibition of photochemiluminescence detector signal produced by 10 microliters of blood serum in comparison with the activity of ascorbic acid as Standard. AOA of the sample studied was expressed in conventional units (c.u.) equal to quantity of Standard in nanomoles with the equivalent activity [6].

4. Statistical analysis. The results of blood biochemical analyses were expressed as mean $\pm$ S.E. The Student's t-test was used to make a statistical comparison between the groups. The significance level was set at $p < 0.05$.

Results and Discussion. According to the results of radioprotective studies, at all the applied schemes of animals preventive treatment Cu.2-Tyr failed to manifest radioprotection. Moreover, at 40 mg/kg dose level both at subcutaneous and oral administration Cu.2-Tyr revealed radiosensibilizing effects and induced enhanced rats mortality rate in comparison with control irradiated group: in the treated groups survival made 30 %, while in untreated irradiated group this index achieved 50 % (tabl. 1).

In opposite to Cu.2-Tyr, the copper complexes containing 3- or 4-pyridinecarboxaldehydes, namely, Cu.3-Tyr and Cu.4-Tyr demonstrated expressed radioprotective activity. Thus, by Day 30 post irradiation in groups of animals either orally or subcutaneously given Cu.3-Tyr at both considered doses 1 hour before irradiation 100% survival was observed. The same results were registered at subcutaneous treatment with 10 mg/kg Cu.3-Tyr 24 hours prior to exposure (tabl.1).

In case of rats prophylactic treatment with Cu.4-Tyr pronounced radioprotective effects were obtained at 40 mg/kg dose level both at oral and subcutaneous mode of administration 1 hour before irradiation that facilitated animal survival increase up to 90%-100% and extended rats average life-span (tabl. 1). It should be noted that at lower dose level Cu.4-Tyr was non-effective as radioprotector.

According to the results of biochemical analyses, in animals of the Control group exposed to irradiation at 500 R a high level of LPO intensity along with a significantly decreased activity of NEWSLMAO were registered in all study days post exposure (tabl. 2).

In rats treated with 10 mg/kg copper complexes the index of LPO activity tended to be maintained within normal values during almost the whole observation period being at significantly lower level compared to Control. As to NEWSLMAO, the preliminary administration of copper complexes to rats before irradiation did not prevent a radiationinduced decrease in the level of this parameter during the early post-exposure period. In case of pre-treatment with Cu.2-Tyr and Cu.3-Tyr the significantly raised NEWSLMAO activity was registered on days 14 and 28. In the late post-exposure period, namely, on day 28, in rats treated with Cu.2-Tyr, Cu.3-Tyr, and Cu.4-Tyr the significantly high level of NEWSLMAO activity was recorded in comparison with Norm and the Control irradiation group as well.

Copper Schiff base complexes, Cu.3-Tyr and Cu.4-Tyr, can be considered as potent radioprotectors equally effective both at oral and subcutaneous treatment prior to radiation exposure. Apparently, the position of carboxaldehyde group with regard to nitrogen of pyridine ring, viz. 3 or 4, is of great importance for manifestation of radioprotective activity of the specified copper complexes derived from pyridine-carboxaldehydes and L-Tyrosine.

Table 1. Survival rate and ALS of animals in 30 post-irradiation days after total body irradiation at 650 R on the background of preliminary subcutaneous or oral administration of 10 and 40/mg/kg copper complexes 1 h or 24 h before exposure
(Irradiated Control: 50% survival and 18.7 days ALS)

Copper complex	Time and mode of the metalcomplex administration to rats before irradiation		Survival, %		ALS, days	
			10 mg/kg	40 mg/kg	10 mg/kg	40 mg/kg
Cu.2-Tyr	1 h	subcutaneous	60	30	23.4	17.8
		oral	60	30	23.0	16.7
	24 h	subcutaneous	50	30	24.7	16.8
		oral	50	30	20.9	16.5
Cu.3-Tyr	1 h	subcutaneous	100	100	30	30
		oral	90	100	27.4	30
	24 h	subcutaneous	100	80	30	25.5
		oral	70	70	26	24.7
Cu.4-Tyr	1 h	subcutaneous	70	100	24	30
		oral	80	90	26.7	28
	24 h	subcutaneous	60	90	24.8	27.6
		oral	50	60	21.8	22.2

Table 2. Blood plasma LPO processes intensity and integral AOA of endogenous NEWSLMAO on days 3, 7, 14 and 28 after rats irradiation at 500 R performed on the background of 10 mg/kg copper complexes at preliminary subcutaneous administration

Indices	Days	Control: 500 R	Cu.2-Tyr + 500 R	Cu.3-Tyr + 500 R	Cu.4-Tyr + 500 R
LPO Norm: 1.10±0.11 nM MDA/ml pl.	3	*1.70±0.04	1.11±0.04**	1.12±0.08**	*1.48±0.03**
	7	*1.71±0.05	*2.39±0.18**	0.87±0.06**	0.85±0.02**
	14	*1.95±0.05	1.41±0.07**	1.01±0.07**	*1.46±0.04**
	28	*1.64±0.09	0.97±0.07**	1.32±0.06**	1.24±0.05**
AOA of NEWSLMAO Norm: 6.84±0.11 c.u.	3	*4.56±0.25	*5.91±0.06	*5.44±0.19**	*5.13±0.04**
	7	*2.66±0.034	*3.12±0.02**	*4.88±0.10**	*3.47±0.196**
	14	*5.43±0.12	*7.61±0.10**	*8.4±0.0.15**	*4.89±0.15
	28	*6.09±0.17	*9.82±0.11**	*9.6±0.0.16**	*8.23±0.18**

Note: * - statistically significant changes compared to Norm; ** - statistically significant changes compared to indices in animals of Control group in the same time intervals after irradiation

Efficient radioprotective properties exhibited by copper organic complexes might be mainly related to their respective support of endogenous non-enzymatic antioxidant defence system and their known SOD- and Catalase-mimetic activities [1, 2, 9].

Acknowledgement. The study was supported by ISTC A-1321 Project and 13-1F342 grant of the State Committee of Science of Armenia.

REFERENCES

1. Autzen S., Korth H., Boese R., Groot H., Sustmann R. Studies of Pyridinyl-Containing 14-Membered Macrocyclic Copper(II) Complexes, Eur. J. Inorg. Chem., **7**, p. 1401-1410, 2003.

2. *Durackova Z., Labuda J.* Superoxide-dismutase mimetic activity of macrocyclic CU(II)-tetraanhydroaminobenzaldehyde (TAAB) complex, *J. Inorg. Biochem*, 58, p. 297-303, 1995.
3. *Meyer E.A., Castellano R.K., Diederich F.* Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 42, 11, p. 1210-1250, 2003.
4. *Mishra N., Poonia K., Kumar D.* An overview of biological aspects of Schiff base metal complexes, *International Journal of Advancements in Research & Technology*, 2, 8, p. 52-66, 2013.
5. *Kostova I., Saso L.* Advances in research of Schiff-base metal complexes as potent antioxidants, *Curr. Med. Chem.*, 20, 36, p. 4609-4632, 2013.
6. *Popov I.N., Lewin G.* Photochemiluminescent detection of antiradical activity: II. Testing of nonenzymic water-soluble antioxidants, *Free Radic. Biol. Med.*, 17, 3, p. 267-271, 1994.
7. *Sorenson J.R.J.* Cu, Fe, Mn, and Zn chelates offer a medicinal chemistry approach to overcoming radiation injury, *Current Med. Chem.*, 9, p. 639-662, 2002.
8. *Sorenson J.R.J., Soderberg L.S., Chang L.W.* Radiation protection and radiation recovery with essential metalloelement chelates, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 210, 3, p. 191-204, 1995.
9. *Thummaruk S., Supaluk P., Theeraphon P., Chartchalerm I., Chanin N., Virapong P.* Copper Complexes of Nicotinic-Aromatic Carboxylic Acids as Superoxide Dismutase Mimetics, *Molecules*, 13, 12, p. 3040-3056, 2008.
10. *Waters M.L.* The Role of Aromatic Interactions in Biomolecular Recognition: Contributions to Affinity and Specificity, *Proceedings of the Beilstein-Bozen Symposium "Molecular Interactions-Bringing Chemistry to Life"*, p.111, Bozen, Italy May 15th – 19th, 2006.
11. *Yoshioka T., Kawada K., Shimada T., Mori M.* Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood, *Amer. J. Obstet. & Gynecol.*, 135, 3, p. 372-376, 1979.

Received on 18.01.2016



Биол. журн. Армении, 1 (68), 2016

МАО-ИНГИБИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ НОВЫХ ЗАМЕЩЕННЫХ ПИРИМИДИНОВ И КОНДЕНСИРОВАННЫХ АЗАГЕТЕРОЦИКЛОВ

А.А. АРУТЮНЯН*, Р.С. СУКАСЯН, А.С. ГРИГОРЯН

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

Изучено влияние некоторых новых замещенных пиримидинов, а также три-, тетра-, пента- и гексациклических азагетероциклов на активность моноаминоксидазы (МАО) мозга крыс *in vitro*. В качестве субстрата использовали серотонин (5-ОТ) креатинин сульфат. Активность МАО определяли в 50%-ном гомогенате мозга. Установлено, что некоторые изученные замещенные пиримидины и конденсированные пиримидины обнаруживают анти-МАО-азные свойства, причем в группе замещенных бензоими-дазохиназолинов предварительно установлены корреляции между строением и антиМАО-азной активностью.

*Бензимидазолпиримидины – пиримидинилдиарилметаны – конденсированные азагетероциклы –
моноаминоксидаза – антимонаминоксидазная активность*

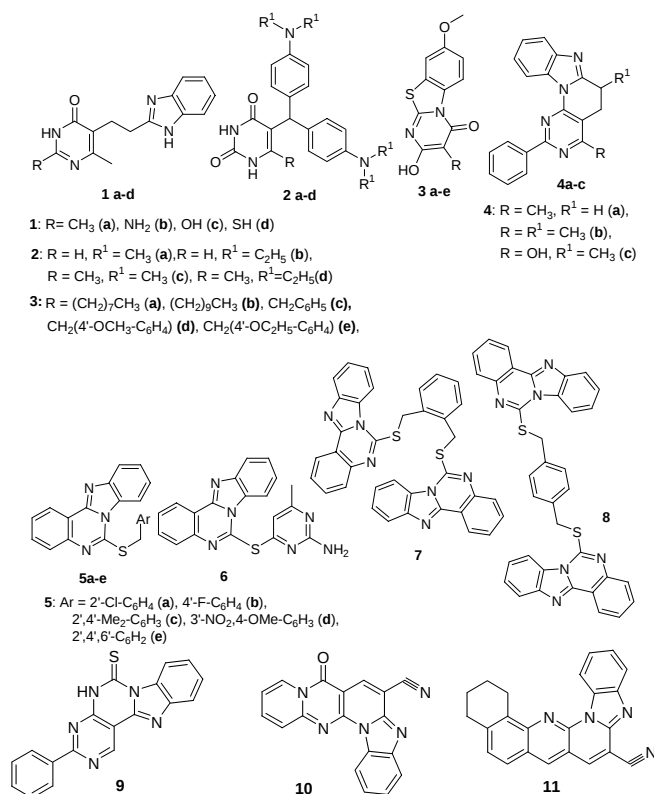
Ուսումնասիրվել է որոշ նոր պիրիմիդինների և տրի-, տետра-, պենտա- և հեքսացիկլիկ կոնդենսացված ազադետերոցիկլների ազդեցությունը ՄԱՕ-ի ակտիվության վրա առնետների ուղեղում *in vitro* պայմաններում: Որպես սուբստրատ օգտագործվել է սերոտոնին (5-ՕՏ) կրեատինին սուլֆատ: ՄԱՕ-ի ակտիվությունը հետազոտվել է 50 %-ոց հոմոգենատում: Պարզվել է, որ ուսումնասիրված որոշ փոխարկված և կոնդենսացված պիրիմիդիններ օժտված են հակամոնոամինօքսիդազային ակտիվությամբ, ի դեպ, փոխարկված բենզոիմիդազոլինա-զոլինների խմբում նախնական ապացուցվել է միացության կառուցվածքի և հակաՄԱՕ-ազային ակտիվության կապը:

*Բենզիմիդազոլիլպիրիմիդիններ – պիրիմիդինիլդիարիլմեթաններ – պոլիկոնդենսացված
պիրիմիդիններ – մոնոամինօքսիդազ –
հակամոնոամինօքսիդազային ակտիվություն*

The antimonoaminooxidase (antiMAO) properties of newly synthesized pyrimidines and condensed azaheterocycles on the rats brain have been investigated. Serotonine (5-OT) creatinine sulfate serves as a substrate. MAO-activity was estimated at 50% brain homogenates. It is now shown that some of the substituted pyrimidines and condensed pyrimidines possess antiMAO activity and activity correlations have been established with respect to benzoimidazoquinazoline derivatives the preliminary structure.

*Benzimidazopyrimidines – pyrimidinyl diaryl methanes – polycondensed
pyrimidines – monoaminooxidase – antimonoaminooxidase activity*

Известно, что одним из следствий процесса глобализации, приведшего к резкому увеличению стрессогенных воздействий на человека, является рост заболеваемости психическими расстройствами, включая различные формы депрессий [6]. Современная медицина располагает большим арсеналом антидепрессивных препаратов различного строения, в том числе в группе ингибиторов моноаминооксидазы (МАО) [7,8], которые, однако, не всегда эффективны и обладают рядом побочных эффектов, в связи с чем поиск новых соединений с указанной активностью представляется обоснованным. Необходимо отметить, что замещенные пиримидины и конденсированные азаетероциклы, являясь структурными аналогами природных пиримидинов и проявляя широкий спектр биологической активности, включая антиаллергическую, противовоспалительную, нейротропную и ряд других, рассматриваются как перспективные классы в поиске новых соединений биомедицинского применения [9]. Целью настоящей работы является исследование влияния на активность моноаминооксидазы (МАО) новых три- и тетразамещенных пиримидинов **1a-d**, **2 a-d** [1-3] и производных малоизученных три-, тетра-, пента- и гексациклических азаетероциклов: бензо[4,5][1,3]тиазоло[3,2-a]пириимидина (соединения **3a-e**), бензо[4',5']имидазо[2',1':6,1]пиридо[2,3-d]пириимидина (**4a-c**), бензо[4,5]имидазо[1,2-с]хиназолина (**5a-e-8**) [5,6], бензо[4,5]имидазо[1,2-с]пиримидо[5,4-е]пириимидина (**9**), бензо[4',5']имидазо[1',2':1,6]пиридо[2,3-d]пиридо[1,2-a]пириимидина **10** и бензо[4,5]имидазо[1,2-a]нафто[2,1-g][1,8]нафтиридина **11** [3,4]:



Материал и методика. Источником моноаминооксидазы (МАО) служил 50 %-ный гомогенат мозга крыс, который получали путем гомогенизирования мозга в стеклянном гомогенизаторе

с равным (по весу) объемом 2,5 %-ного раствора “аркопал”. В полученном 50 %-ном гомогенате определяли активность МАО [5]. Опытные пробы содержали 0,2 мл гомогената, 0,18 мл раствора исследуемого соединения и 0,18 мл раствора субстрата. Объем пробы доводили до 1,8 мл 0,1 М К-Na-фосфатным буфером до pH 7,4. В качестве субстрата использовали серотонин (5-ОТ) креатинин сульфат моногидрат, который добавляли к пробам после 30-минутной преинкубации фермента с исследуемым веществом при комнатной температуре. Содержание серотонина в пробе – 10 мкмоль/проба. Насыщение кислородом проводили в течение 5 мин при 37 °С и далее пробы инкубировали в течение 45 мин при 37 °С в атмосфере кислорода. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 50 %-ной трихлоруксусной кислоты. Белок осаждали центрифугированием при 3000 об/мин. В безбелковой надосадочной жидкости определяли содержание аммиака методом изометрической отгонки в течение 24 ч с последующей нesslerизацией и фотометрированием на фотометре-нефелометре ФЭК-56-2. Активность МАО выражена в процентах к контролю. Каждое соединение испытано в 3-4 опытах (средние данные 4-х опытов), которые приведены в табл. 1.

Таблица 1. Влияние исследованных соединений на дезаминирование серотонина (5-ОТ) моноаминоксидазой (МАО) мозга *in vitro* *

Соединение	Ингибирование активности МАО в % к контролю	P
1a	33±3	<0.05
1b	16±5	**
1c	59±3	<0.05
1d	19±6	—
2a	20	—
2b	45±1	<0.05
2c	57±8	<0.05
2d	0	—
3a	12	—
3b	19	—
3c	30	<0.05
3d	12	—
3e	15	—
4a	7	—
4b	7	—
4c	36	<0.05
5a	28±3	<0.05
5b	37±4	<0.05
5d	54±3	<0.05
5e	0	—
6	21±7	—
7	0	—
8	40±3	<0.05
9	32±4	<0.05
10	52±4	<0.05
11	20±5	—

*Концентрация соединений – 1 мкмоль/мл пробы, субстрат – серотонин (5-ОТ).

За 100% принята интенсивность дезаминирования серотонина в контрольных пробах.

**В случае неактивных соединений данные не усреднены.

Результаты и обсуждение. Согласно полученным данным, среди замещенных 5-(бензимидазол-2-ил) пиримидинов **1a-d** и пиримидиновых аналогов три-арилметанов **2a-d** только производное 6-метилурацила **1c** и урацила **2b** проявляют антиМАО-азную активность, угнетая дезаминирование 5-ОТ на 59 и 45% соответственно (см.табл.1). Производные три- и тетрациклических гетероциклов

(соединения **3a-f**, **4a-c**) в концентрации 1 мкмоль/мл обладают слабой (7-36%) антиМАО-азной активностью. Следует отметить, что в ряду S-арилметилсульфанилбензо[4,5]имидазо[1,2-с]хиназолинов **5a-e**, **7**, **8** выявлена зависимость между строением и антиМАО-азной активностью.

Так, производные с электроноотрицательными заместителями в бензильной группе указанной гетероциклической системы проявляют определенные антимоноаминоксидазные свойства, причем параллельно с ростом электроотрицательности заместителей антимоноаминоксидазная активность соединений возрастает от 28% у 2-Cl-производного **5a** до 37% у 4-F-производного **5b** и достигает 54% торможения у соединения с 3-NO₂-4-ОСН₃-бензильной группой **5d**. В то же время присутствие в бензильной группе двух и трех электронодонорных СН₃-групп, проявляющих +I-эффект, резко ослабляет ингибирующие свойства соединений **5c** и **5e** вплоть до исчезновения антиМАО-азной активности.

Еще более резкое различие антимоноаминоксидазной активности отмечено у двух S-замещенных позиционных изомеров 5,6-дигидробензо[4,5]имидазо[1,2-с]хиназолин-6-тионов **7,8**: от 0% у орто-замещенного димера **7** до 44% у пара-замещенного димера **8**. В заключение отметим, что представители трех новых тетра-, пента- и гексациклических гетероциклических систем (соединения **9**, **10**, **11**) также обнаруживают некоторые антимоноаминоксидазные свойства (торможение активности фермента на 32, 52 и 20% соответственно).

Таким образом, в результате проведенной работы среди новых замещенных 5-(2-бензимидазолил)пиримидинов и пиримидинил-5-диарилметанов впервые обнаружены соединения с антимоноаминоксидазной активностью. Такая же активность отмечена в ряду новых конденсированных пиримидинов, которая более выражена у S-арилметилсульфанилбензо[4,5]имидазо[1,2-с]хиназолинов, содержащих электроноотрицательные группы в бензильном остатке.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.А.Арутюнян. Синтез производных новой гетероциклической системы 5,6-дигидробензо[4',5']имидазо[2',1':6,1]пиридо[2,3-d]пиримидина. Хим.ж.Армении, **65**, 2, с. 257-260, 2012.
2. Арутюнян А.А. Синтез бисарилметильных производных пиримидинов и хинолинов. ЖОрХ., **50**, 1, с. 66-68, 2014.
3. Арутюнян А.А. Синтез тетра- и пентагетероциклических систем и производных бензимидазо[1,2-с]хиназолина. ЖОрХ., **50**, 1, с. 100-105, 2014.
4. Арутюнян А.А. Синтез новых пента- и гексациклических полиазотистых конденсированных гетероциклических систем из 2-(цианометил)бензимидазола ЖОрХ., **50**, 1, с. 152-153, 2014.
5. Маркосян А.Н., Диланян С.В., Арсенян Ф.Г., Сукасян Р.С., Гарибджанян Б.Т. Синтез, противоопухолевые и антимоноаминоксидазные свойства 2,4,4-тризамещенных триазолобензо[h]хиназолинов. Хим. фарм.ж, **44**, 3, pp. 3-5, 2010.
6. Bruce T.J., Saeed S.A. Social anxiety disorder: a common, underrecognized mental disorder. Am. Fam. Physician, **60**, 8, pp. 2311-2320, 1999.
7. Fiedorowicz J.G., Swartz K.L. The role of monoamine oxidase inhibitors in current psychiatric practice. J. Psychiatr. Pract., **10**, 4, pp. 239-248, 2004.
8. Geldenhuys W.J., Darvesh A.S., Funk M.O., Van der Schyf C. J., Carroll R.T. Identification of novel monoamine oxidase B inhibitors by structure-based virtual screening. Bioorg. Med. Chem. Lett., **20**, 17, pp. 5295-5298, 2010.
9. Singh R., Chouhan A. An overview of biological importance of pyrimidines. World J. Pharmacy Pharm Sci., **3**, 12, pp. 574-597, 2014.

Поступила 18.11.2015



Biolog. Journal of Armenia, 1 (68), 2016

MODIFICATION OF GROWTH CONDITIONS BY MM-WAVES OF WOOD-DECAYING MUSHROOM'S CULTURES

I.A. AVAGYAN

*Yerevan State University, department of botanics and mycology
inesa.avagyan@ysu.am*

Basidial macromycetes are not only value food, but can be used as source of such biological active compounds as the genistein, β -glucans, glioxal-oxidase et al. In this work we used different frequencies of extremely high frequency of electromagnetic irradiation (EHF EMI) with the aim of obtaining mushroom cultures with increased fermentative activity by the modulation of its growth conditions during growth on the peptone media. We investigated the influence of the non-thermal extremely high frequency electromagnetic waves in the interval of 45-53 GHz on β -glucosidase activities of two species of wood-decaying mushroom.

In this study we examined the most popular edible wood-decaying mushroom *Pleurotus ostreatus*, which is wide-spread in the forests and commercial mushroom *Lentinula edodes*, under influence of such an abiotic factor as the extremely high frequency waves in the interval of 45 GHz – 53 GHz during 20 and 40 min on the 7th day of mycelial culture's growth. After the treatment of cultures we continued their growth and on the 3th day we examined the influence of these waves on fermentative activity of mycelial extracts. The some conditions of such treatment led to significant rising of β -glucosidase activities in the extracts of mycelial cultures.

Basidiomycetes – betta-glucosidase – Lentinula edodes – mm-waves – Pleurotus ostreatus

Բազիդիալ մակրոմիցետները օժտված են ոչ միայն բարձր սննդային հատկություններով, այլ նաև ծառայում են որպես արժեքավոր հումք այնպիսի կենսաակտիվ միացությունների համար, ինչպիսիք են գինեստին β -գլյուկանները, գլիօքսալ-օկսիդազը և այլն: Աշխատանքում օգտագործվել են գերբարձր հաճախությունների էլեկտրամագնիսական ճառագայթների տարբեր հաճախություններ՝ նպատակ ունենալով ստանալ սնկերի կուլտուրաներ (մշակույթներ), օժտված ավելի բարձր ֆերմենտային ակտիվությամբ, փոփոխելով միցելիումի աճի ընթացքում պեպտոնային միջավայրում պայմանները: Ուսումնասիրված է ոչ ջերմային գերբարձր հաճախությամբ էլեկտրամագնիսական ճառագայթման ազդեցությունը 45 ԳՀց – 53 ԳՀց միջակայքում երկու տեսակի փայտ քայքայող սնկերի β -գլյուկոզիդազ ֆերմենտի ակտիվության վրա:

Աշխատանքում հետազոտված են ուտելի փայտ քայքայող սնկեր՝ *Pleurotus ostreatus*, լայնորեն տարածված լայնատերև անտառներում, և առևտրային սունկ *Lentinula edodes*, այնպիսի աբիոտիկ գործոնի ներքո, ինչպիսիք են գերբարձր հաճախության էլեկտրամագնիսական ճառագայթները 45 ԳՀց – 53 ԳՀց միջակայքում՝ 20 րոպե և 40 րոպե տևողությամբ միցելիումի աճի 7-րդ օրը: Միցելիումի, մշակումից հետո 3-րդ օրը հետազոտվել է ԳԲՀ ԷՄՃ ազդեցությունը միցելիալ լուծամզուկների ֆերմենտային ակտիվությունը: Ցույց է տրվել, որ մշակման որոշակի պայմանները խթանում են β -գլյուկոզիդազ ֆերմենտի շոշափելի աճ միցելիալ լուծամզուկներում:

*Բազիդիոմիցետներ – փետտա-գլյուկոզիդազ – ՄՄ-ալիքներ –
Lentinula edodes – Pleurotus ostreatus*

Базидиальные макромицеты обладают не только большой питательной ценностью, но служат также источником таких биологически активных соединений как гинестин, β -глюканы, глиоксаль-оксидазы и др. В работе были использованы различные частоты крайне высоких частот электромагнитного излучения с целью получения культуры грибов с повышенной активностью ферментов, модулируя условия выращивания в течении роста мицелия на пептонной среде. Исследовано воздействие нетепловых крайне высокочастотных электромагнитных волн в интервале 45-53 ГГц на активность β -глюкозидаз двух видов дереворазрушающих грибов.

В данной работе исследованы съедобные дереворазрушающие грибы: *Pleurotus ostreatus*, широко распространенный в лиственных лесах, и коммерческий гриб *Lentinula edodes* под воздействием такого абиотического фактора как электромагнитные волны крайне высоких частот в интервале 45 ГГц - 53 ГГц в течение 20 и 40 мин на 7 день роста мицелиальной культуры. После обработки культуры мы продолжали культивирование и на 3 день после обработки исследовали воздействие этих волн на ферментативную активность мицелиальных экстрактов. Некоторые экспозиции такой обработки приводили к значительному возрастанию активности β -глюкозидаз в экстрактах мицелиальных культур.

*Базидиомицеты – бета-глюкозидаза – ММ-волны –
Lentinula edodes – Pleurotus ostreatus*

Cellulose is the main polymeric component of the plant cell wall, the most abundant polysaccharide on Earth, and an important renewable resource. Basidiomycetous fungi belong to its most potent degraders because many species grow on dead wood or litter, in environment rich in cellulose. Fungal cellulolytic systems differ from the complex cellulolytic systems of bacteria. For the degradation of cellulose, basidiomycetes utilize a set of hydrolytic enzymes typically composed of endoglucanase, cellobiohydrolase and β -glucosidase [3]. β -glucoside glucosidase commonly called β -glucosidase catalyzes the hydrolysis of alkyl and aryl- β -glucosides such as diglucoside and oligosaccharides. These enzymes are widely used in various biotechnological processes, including the production of fuel ethanol from cellulosic agricultural residues [4] and used for the synthesis of β -glycosides. In the production of flavors in food, β -glucosidase is also a key enzyme in the enzymatic release of aromatics glucosidic precursors present in fruits and enzymatic products. On the contrary, many aromatic organic compounds such as monoterpenols, C-13 norisoprenoids, shikimate-derived compounds accumulate in fruits as flavorless precursors linked to mono- or diglycosides and requires enzymatic or acidic hydrolysis for the liberation of their flavors [11]. Finally, β -glucosidase activity may also improve the organoleptic properties of citrus fruit juices, in which the content of the bitterness caused by glucosidic compounds, for example of naringin for hydrolysis of which requires the sequential processing by β -rhamnosidase and β -glucosidase [10].

It has been established that certain monoterpenol grapes (linalool, geraniol, nerol, citronellol, β -terpineol and linalool oxide) connected to diglycosides such as 6-O- β -L-rhamnopyranosyl, 6-O- β -L-arabinofuranosyl and 6-O- β -D-apiofuranosyl- β -D-glucosides, which define the quality of the wine flavoring [5]. For the enzymatic hydrolysis of these compounds are required sequence of reactions cleave 1...6 bond, and then, aromatic compounds are released from the monoglucosides by influence of β -glucosidase [9]. In contrast to acid hydrolysis, enzymatic hydrolysis is very efficient and does not lead to a modification of aromatic character. However, grape and yeast glucosidase show up least activity on glucosides- monoterpenes in the wine industry, and most aromatic fractions predecessors left untreated. Addition of exogenous β -glucosidase during or after the fermentation is more effective to improve hydrolysis glyucose-binding aromatic components to improve the flavor of the wine. Addition of exogenous β -glucosidase during or after fermentation

proved to be more effective for improving hydrolysis of the glucose-binding of aromatic components in order to improve the flavor the wine. Ideal β -glucosidase should operate and be sustained at low pH values (around pH 2.5 to 3.8) and should to keep activity at high glucose concentrations (10-20%) and in the presence of 10-15% ethanol. However, most of the bacterial β -glucosidase are very sensitive to inhibition by glucose and glucono- β -lactone, and to compounds produced by the grapes-striking mushrooms [9].

The aim of this study was to identify and obtain the optimal exposure of processing of edible mushrooms' cultures by mm-waves for increasing the activity of the enzyme β -glucosidase in mycelial extracts of mushrooms. Such cultures with increased activity of the enzyme will be a good source for obtaining an activity and stability enzyme for further use in the food and wine processing.

Materials and methods. Treatment of mushrooms' mycelial cultures. Culture of a mushrooms treated with low intensively coherent extremely high frequency of electromagnetic irradiation (EHF EMI) duration of 20 and 40min on the 7th day of growth mycelial fungal cultures of *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. The source of irradiation served as a high-frequency signal generator G4-141 EMI (Russia) in the range 45 GHz - 53 GHz. Irradiation was carried out during 20 and 40 min with irradiation power 0.64 mW/cm². Culture continued to grow in the thermostat after a single exposure. On the 3rd (10 days mycelium) days after irradiation of cultures obtained intracellular extracts of the fungus for further their studies. As a control used unexposed culture extract of the mushrooms.

Obtaining mycelia extracts. For intracellular extract mycelium gently scraped from the agar surface in a Petri dish, weighed, and triturated in a pre-cooled mortar (to prevent inactivation of peroxidases) with glass beads by adding 0.15 M Tris-HCl buffer, pH = 8.0 [7]. The buffer was added at the rate of 0.2 ml buffer per 100 mg of mycelium. The extract was separated by centrifugation on the cold for 20 min at a speed of 18,000 rev / min in a centrifuge Mechanika Precyzyjna (Poland). For further analysis of the protein amount and enzymatic activity of the mycelial extracts was used supernatant.

Determination of activity of β -glucosidase. The enzyme activity of mycelial extracts of cultures was determined in a reaction mixture, containing 1 ml of mycelia extract, 2 ml 5 mM nitrocellulose prepared in 100 mM acetate buffer pH = 5.0. The reaction was initiated by incubating the homogenate for 15 min at 50°C and stopped by cooling on ice or by addition of 1 M Na₂CO₃ [9]. The reaction was followed and estimate absorption at $\lambda = 400$ nm on spectrophotometer.

Statistical analysis of the data. The graphs show the average arithmetic value and a standard deviation of four biological replicates of each. In processing the data by the method of the t-test of Student's determined confidence intervals for the average impact of EHF EMR at 5% significance level.

Results and Discussion. The need to find β -glucosidase enzymes with preferred properties has led many researchers to find new suitable sources. Recently it has been shown that extracellular glucose-stable and pH-resistant β -glucosidase activity can be produced by strains of *Aspergillus* [9]. However, the enzyme having interest is consist only a minor fraction of the entire β -glucosidase activity, and a large fraction of highly sensitive to inhibition by glucose. As shown *Aspergillus oryzae* has proved effective producer of the minor form of glucose-tolerant β -glucosidase enzyme when grown on quercetin, phenolic flavonoid found in plant cell walls [9]. Researches and searching for other sources of plant and mushroom β -glucosidase, tolerant to glucose inhibition, continues. Perhaps modifying the growth conditions also can lead to producing resistant forms of the enzyme.

The need for more suitable enzymes had led us and other workers to search for novel β -glucosidases with desired properties. In view of the foregoing by the facts it was initiated search for suitable fungal cultures that rich in β -glucosidase enzyme by modulating the growth conditions to achieve increasing of enzyme activity. It allows using such crops as a raw material for producing an enzyme required in many areas of the food industry. Our selection was focused on wood-destroying fungi, because they contain two major enzymatic system-cellulolytic and ligninolytic. Basidiomycetes are the most potent destructors of

cellulose, since many of them grow on dead wood – in an environment rich in dietary fiber. Classic range of mushroom cellulolytic enzymes consists of endo- and exolytic enzymes acting on cellulose. Obtaining cellobiose further processed by β -glucosidases till produce glucose, is illustrated in the scheme (fig. 1).

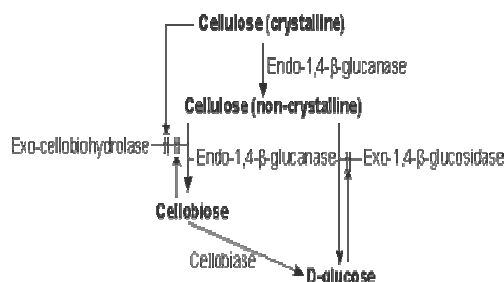


Fig. 1. Outline of the relationship between the enzyme activities in the hydrolysis of cellulose. || represents inhibitory effects. Endo-1,4-b-glucanase is the rate-controlling activity and may consist of a mixture of enzymes acting on cellulose of different degrees of crystallinity. It acts synergistically with both exo-1,4-b-glucosidase and exocellobiohydrolase. Exo-1,4-b-glucosidase is a product-inhibited enzyme. Exocellobiohydrolase is product inhibited and additionally appears to be inactivated on binding to the surface of crystalline cellulose.

The enzyme β -glucosidase was detected by us in the wood decaying fungi *Pleurotus ostreatus*, which is also serve as an important taxonomic index in determining the systematic affiliation of wood Basidiomycetous fungi [5, 8].

We used different frequencies EHF EMI to modulate the growth conditions of the oyster mushroom and shiitake cultures in order to obtain optimal high enzymatic activities of the mycelial extracts in response to stressful impact of external abiotic factors. In our experiments we were obtained oyster mushroom culture with a high activity of the β -glucosidase enzyme by changes in growth conditions. Thus, in the diagram presented on fig. 2, shows that at frequencies of 49 GHz treatment during 20 min the β -glucosidase activity is maximized – increasing by 2 times relative to the control culture. To the increase of the enzyme activity also results treatment at frequency of 51.8 GHz, with an exposure of 20 min (1.2-fold) and a frequency of 46 GHz, 40 min (1.5-fold) relative to the control. The smallest value of β -glucosidase activity reaches at 53 GHz for 20 min and 45 GHz for 40 min, among all of the studied exposures.

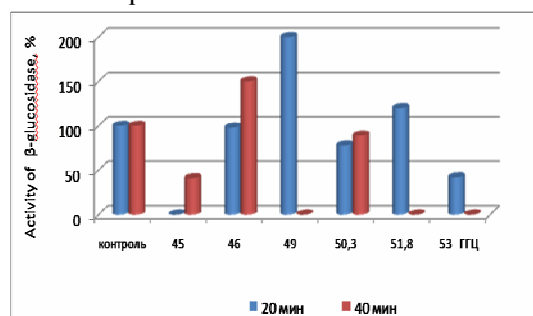


Fig. 2. Dependence of β -glucosidase activity in mycelial extracts of *P.ostreatus* from frequency and duration of mm-waves treatment.

In addition, all biological systems producing hydroxyl radicals based on cellobiose dehydrogenase, quinine redox cycling or glycopeptides-based Fenton reaction are involved in the degradation of several plant cell wall components, including cellulose. The complete cellulolytic complex used by a single fungal species is typically composed of more than one of the above mechanisms that contribute to the utilization of cellulose as a source of carbon or regulation of cellulose degradation differs among wood-rotting, litter-decomposing, mycorrhizal or plant pathogenic fungi and yeast due to the different roles of cellulose degradation in the physiology and ecology of the individual groups [11].

We examine influence of mm-waves on β -glucosidase activity and on commercial Chinese medicinal mushroom *Lentinula edodes*, or better known as shiitake. Data on the changes in β -glucosidase activity in extracts of shiitake culture are presented in fig. 3. Studies have demonstrated positive effects on the culture of the fungus at mm-wave frequencies of 53 GHz for 20 min by increasing the activity of this enzyme is almost 2 times. Increasing exposure time to 40 min resulted in more sustained beneficial effect: at frequencies of 45 GHz, 49 GHz and 53 GHz was observed an increase in enzyme activity is more than two times. Processing mm-wave frequencies at 50.3 GHz and 51.8 GHz for 40 min also led to an increase in enzyme activity of about 1.5 and 1.2 times, respectively.

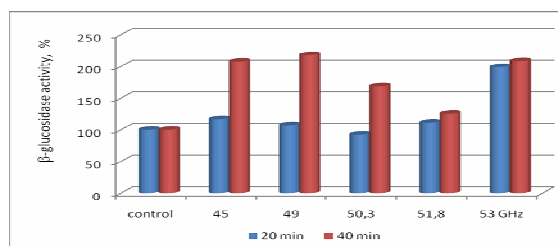


Fig. 3. Dependence of β -glucosidase activity in mycelial extract *Lentinula edodes* from frequency and duration of mm-waves treatment.

It has been previously shown effects of mm-wave in the same range of frequencies on the peroxidase activity of mycelia extracts from three types of wood-decaying mushrooms, as the peroxidase enzyme is part of the ligninolytic system of fungi. The most sensitive effects have been obtained en treated by mm-waves on culture of wood-destroying fungi *P.ostreatus* [2]. Processing cultures of the fungus is not only increased metabolic and fermentative activities, but also enhanced the anti-inflammatory activity of studied extracts [1].

Researches and searching for other sources of plant and mushroom β -glucosidase, tolerant to glucose inhibition are continuing by many researchers. Perhaps such modifications of conditions during growth of wood-destroying mushrooms` culture can also be a good source for resistant forms of the enzyme. However, these studies need to continue to identify the optimum conditions of treatment by mm-waves to produce highly tolerant to inhibition by glucose β -glucosidase.

Thus, the obtained changes in the metabolic activity of the cultures we studied wood-destroying fungi under the influence of external abiotic factors that are expressed as a change in biomass and the increase of enzymatic activity of two studied fermentative complexes – ligninolytic and a cellulolytic.

The data of our study can be used for resolving the problem of the bioconversion - for utilization of hard degradable polymers of the wood cell walls, and as an enzyme-rich raw materials for use in the food industry and pharmaceuticals [1, 2].

REFERENCES

1. Avagyan I.A. Vozmozhnosti primeneniya gribnykh extractov v terapevticheskikh celyach, Pharma, 9, p. 100-104, 2014.
2. Avagyan I.A., Nerkararyan A.V., Minasbekyan L.A., Nanagulyan S.G. Izmenenie metabolic-heskoj aktivnosti kulitury *Pleurotus ostreatus* pod vozdeistviem electromagnitnykh izluc-henij, Mikologiya and Phytopatologiya, 45, 6, p. 541-547, 2011.
3. Baldrian P., Valaskova V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi, FEMS Mic-robiol. Rev., 32, 3, p. 501-531, 2008.
4. Bothast R.J., Saha B.C. Ethanol production from agricultural biomass substrates, Adv. Appl. Microbiol., 44, p. 261-286, 1997.
5. Danilyak N.I., Semichaevskoi V.D., Dudchenko L.G., Trutneva I.A. Fermentnye sistemy vys-shich bazidiomycetov. Kiev, Naukova Dumka, 1989.
6. Günata Z., Dugelay I., Vallier M.J., Sapis J.C., Bayonove C. Multiple forms of glycosidases in an enzyme preparation from *Aspergillus niger*: partial characterization of an apiosidase, Enzyme Microb. Technol., 21, p. 305-312, 1997.
7. Methody experimentalnoi mikologii. Spravochnik, Kiev, Naukova Dumka, 1982.
8. Michailova O.B., Poedinok N.L., Diakov M. Yu., Kamzolkina O.V. Fermentativnaya akti-vnosti novykh introducirovannykh shtammov bazidiomycetov, Immunology, allergology, infectology, 1, p. 259-260, 2001.
9. Riou C., Salmon L.M., Vallier M.J., Günata Z., Barre P. Purification, Characterization, and Substrate Specificity of a Novel Highly Glucose-Tolerant β -Glucosidase from *Aspergillus oryzae*, Appl. Env. Microbiol., 64, 10, p. 3607-3614, 1998.
10. Roitner M., Schalkhammer T., Pittner F. Characterisation of naringinase from *Aspergillus niger*. Monatshefte für Chemie Monatsch, Chem. 115, p. 1255-1267, 1984.
11. Winterhalter P., Skouromounis G.K. Glycoconjugated aroma compounds: occurrence, role and biotechnological transformation, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 55, p. 73-105, 1997.

Received on 18.01.2016



Биол. журн. Армении, 1 (68), 2016

**РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНОГО СПОСОБА ВЫДЕЛЕНИЯ СЛАДКИХ
ГЛИКОЗИДОВ ИЗ ЛИСТЬЕВ СТЕВИИ (*STEVIA REBAUDIANA* BERTONI),
ВЫРАЩЕННОЙ В РЕСПУБЛИКЕ АРМЕНИЯ И НАГОРНОМ КАРАБАХЕ**

**В.Т. КОЧИКЯН¹, Л.С. МАНУКЯН¹, А.О. ЦАТУРЯН¹, А.С. САГИЯН¹,
А.Т. КОЧИКЯН², Л.Э. ОГАНЕСЯН³, Г.Ю. ОВСЕПЯН⁴, М.А. БАБАХАНИЯН³**

¹ НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА,
vahe-ghochikyan@yandex.ru

² Кафедра технологии лекарств ЕГМУ им. М. Гераци

³ Институт проблем гидропоники им. Г.С. Давтяна НАН РА

⁴ Научный центр Арцаха НКР

Предложен экономически эффективный способ получения сухого очищенного экстракта из листьев *Stevia rebaudiana* Bertoni. Показано, что оптимальными условиями для экстракции дитерпеновых гликозидов являются pH-3,5 и температура 65°C. С применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии определено содержание органических кислот в разных экстрактах листьев *Stevia rebaudiana* Bertoni. Показано, что наиболее предпочтительным сырьем для получения дитерпеновых гликозидов являются листья стевии, выращенные в Нагорном Карабахе.

*Стевиозид – ребаудиозид А – Stevia rebaudiana Bertoni –
дитерпеновые гликозиды – экстракция – гидропоника*

Առաջարկվել է *Stevia rebaudiana* Bertoni բույսի տերևներից՝ մաքրված չոր լուծամզվածքի ստացման արդյունավետ եղանակ: Ցույց է տրվել, որ դիտերպենային գլիկոզիդների լուծամզման համար օպտիմալ պայմաններ են հանդիսանում pH-3,5 և 65°C ջերմաստիճանը: Բարձր արդյունավետության հեղուկ քրոմատոգրաֆիայի մեթոդի կիրառմամբ որոշվել է *Stevia rebaudiana* Bertoni բույսի տերևների տարբեր լուծամզվածքներում օրգանական թթուների պարունակությունը: Ցույց է տրվել, որ մեղրախոտի դիտերպենային գլիկոզիդների ստացման համար առավել զերադասելի հումք է հանդիսանում Լեռնային Ղարաբաղում ստացված կենսազանգվածը:

*Ստեիոզիդ – ռեբաուդիոզիդ – A – Stevia rebaudiana Bertoni –
դիտերպենային գլիկոզիդներ – լուծամզում – հիդրոպոնիկա*

The economically efficient method for the production of dry purified extract from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves has been proposed. It was shown that the optimal conditions for the extraction of diterpene glycosides were pH-3.5 and 65 °C. The content of organic acids in various extracts of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves was determined by high-performance liquid chromatography. The most preferred raw materials for production of diterpene glycosides of stevia were shown to be leaves grown in Nagorno-Karabakh.

*Stevioside – rebaudioside A – Stevia rebaudiana Bertoni –
diterpene glycosides – extraction – hydroponics*

В настоящее время известно много растений с содержанием соединений, по сладости превосходящих сахарозу в сотни и тысячи раз, таких как диоскорефеллум (*Dioscorephellum cumminsii*), липпия (*Lippia dulcis*), хемслея (*Hemsleya panicis-scandens*), синсепалу (*Syncephalum dulcificum*), момордика (*Thladiantha grosvenorii*, syn. *Momordica grosvenorii*). Коммерческое использование их как сырья для производства сахарозаменителей ограничено либо трудностью сбора плодов и нетехнологичностью переработки, либо токсичностью экстракта [6-7].

Сладкие дитерпеновые гликозиды стевии (стевиозид, ребаудиозид А и др.) натуральные подсластители, которые накапливаются в растении стевия *Stevia rebaudiana* Bertoni, р. *Stevia* сем. астровых (*Compositae*). Род *Stevia* насчитывает 154 вида, но лишь в двух из них накапливаются сладкие гликозиды, причем содержание их максимально в надземной части *S. rebaudiana* Bertoni – от 8 до 15% в пересчете на сухой вес [8]. Родиной стевии считается Парагвай. Парагвайские индейцы называют ее Каа-хее, что означает медовая трава. Широко культивируется в странах Южной Америки, Японии, Корее, Тайвани, Малазии [2-5]. В последние годы стевию начали культивировать в Армении методом гидропонии и в Нагорном Карабахе [1].

Экстракт стевии содержит смесь различных дитерпеновых гликозидов, которые имеют единую основу – стевиол и отличаются содержанием углеводных остатков в положении С13 и С19. Из экстракта стевии выделены и идентифицированы стевиозид, ребаудиозиды А, В, С, D и Е, дулкозид А, рубузоид и стевиолбиозид. Основным компонентом среди них является стевиозид (5-10% м./м.), ребаудиозид А (2-4% м./м.), ребаудиозид С (1-2% м./м.) и дулкозид А (0.4-0.7% м./м.) [12-15]. Все выделенные гликозиды обладают повышенной сладостью по отношению к сахарозе, которая для стевиозида составляет 200-280; ребаудиозида А – 400-450; ребаудиозида В – 300-350; ребаудиозида С – 50-120; ребаудиозида D – 250-450; ребаудиозида Е – 150-300; дулкозида А – 50-120; рубузозида – 120-200 и для стевиолбиозида – 100-125 [11].

Стевиозид и другие гликозиды стевии, кроме интенсивной сладости, обладают низкой калорийностью, а также уникальными биологическими свойствами [9, 10, 12, 18, 19]. При его регулярном употреблении снижается содержание сахара, радионуклидов и холестерина в организме человека, улучшается регенерация клеток и коагуляция крови, тормозится рост новообразований, укрепляются кровеносные сосуды. Он проявляет также желчегонное, противовоспалительное и диуретическое свойства, препятствует образованию язв в желудочно-кишечном тракте [3].

Задача настоящей работы состояла в разработке способа получения сухого очищенного экстракта из листьев стевии, выращенных в Армении и в Нагорном Карабахе.

Материал и методика. В качестве сырья использовались листья стевии, выращенные как методом гидропонии, так и в почве Арагатской равнины, Нагорного Карабаха, а также листья, привезенные из Украины. Работы по выращиванию стевии проводились в рамках проекта тематического финансирования 13-1Ф072 Министерства образования и науки РА Государственного комитета по науке. Влажность исходного сырья составляла 4,2%. Чистота и подлинность полученных образцов подтверждались методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

ТСХ осуществлялся на пластинках TLC силикагель 60 F254 (Merck, Германия). На стартовую линию пластинки для ТСХ микропипеткой наносили 0,01мл испытуемого раствора и 0,01мл 1%-ного раствора стандартного образца стевиозида в метаноле, высушивали на воздухе в течение 10 мин и хроматографировали восходящим способом в камере с системой растворителей: хлороформ-метанол-вода (60:30:6). В качестве проявителя использовали 50%-ный раствор серной кислоты [4].

Экстракты листьев стевии упаривали на вакуумно-испарительной установке Laborota 4000/HB/G3 (Heidolph, Германия). Содержание органических кислот определяли методом ВЭЖХ на приборе “Water Separations Modul 2695” (США). Редуцирующие вещества определяли методом Шомоди-Нельсона [16-17].

Результаты и обсуждение. В качестве экстрагентов для выделения сладких дитерпеновых гликозидов чаще всего используются органические растворители, такие как метанол, этанол, диэтиловый эфир, ацетон, изопропиловый спирт и ацетонитрил. Однако при использовании этих растворителей в экстракт переходит большое количество органических веществ, прежде всего пигментов, препятствующих дальнейшему осветлению экстракта. Принимая во внимание лечебно-профилактическую ценность гликозидов стевии, в качестве экстрагента нами использовалась вода, благодаря которой максимально снижалось содержание сопутствующих примесей. Экстракцию дитерпеновых гликозидов проводили при различных pH (7,0; 6,5; 6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0) с целью определения оптимальных условий. Полученные результаты показали, что с уменьшением pH повышается выход гликозидов, однако при pH-3,0 и ниже наблюдается частичный гидролиз стевиозида. В целях оптимизации процесса экстракции дитерпеновых гликозидов нами было изучено влияние таких параметров, как степень измельчения сырья, соотношение сырьё-экстрагент, температура экстрагента и продолжительность процесса. Для определения оптимальной температуры и продолжительности процесса экстракцию проводили при следующих температурах (30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70°C). Наибольшее извлечение дитерпеновых гликозидов из растительного сырья обеспечивала экстракция десятикратным объемом воды (pH-3,5) в течение 3 ч при температуре 65°C. Оптимальный размер частиц сырья 0,5-1,0 мм. После экстракции раствор фильтровали и с помощью $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pH фильтрата доводили до 10. Выпавший осадок отделяли центрифугированием. Надосадочную жидкость обесцвечивали активированным углем (10-15 г угля на 1 л жидкости) при 70°C с перемешиванием в течение 30 мин. Получали экстракт темно-коричневого цвета. Для обессоливания полученного экстракта использовали ионообменный метод. Экстракт пропускали через две ионообменные колонки, заполненные сульфокатеонитом в H^+ – форме и среднеосновным анионитом в OH^- – форме. Линейная скорость потока раствора по направлению снизу вверх составляла 0,05 см/с. На выходе из колонки раствор имел желтоватый цвет. Затем водный раствор упаривали на вакуумно-испарительной установке досуха. Получали сухой порошок дитерпеновых гликозидов стевии желтоватого цвета. Процесс экстракции представлен в виде схемы (рис.1).

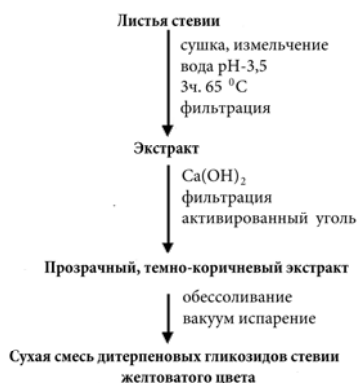


Рис.1. Схема получения смеси дитерпеновых гликозидов из листьев стевии

Выход дитерпеновых гликозидов составлял 69-83%, содержание в нём моносахаридов варьировало от 0,05-0,12% в зависимости от использованного образца (табл. 1).

Таблица 1. Выход дитерпеновых гликозидов из различных образцов листьев стевии

	Образцы листьев стевии	Выход дитерпеновых гликозидов, % (от содержания в сырье)	Содержание моносахаридов в конечном продукте, %
1.	Гидропоника	76	0,07
2.	Почва (Арагатская равнина)	81	0,09
3.	Почва Украина (Крым)	69	0,12
4.	Почва Нагорного Карабаха (Аскеранский район)	83	0,05

Органические кислоты – большая и разнообразная по своим свойствам группа веществ, содержащаяся в большинстве пищевых и лекарственных растений. Наиболее часто встречаются такие органические кислоты, как яблочная, лимонная, янтарная, щавелевая, уксусная, винная, молочная. Они оказывают на организм человека достаточно разнообразное действие: содержащиеся в цветках ромашки, в коре белой ивы бензойная и салициловая кислоты - антисептическое действие; содержащиеся в листьях подорожника, мать-и-мачехи, побегах топинамбура производные кофейной и других оксикоричных кислот - желчегонное, противовоспалительное действие; урсоловые кислоты и их производные обладают детоксицирующими свойствами, выводят из организма продукты обмена веществ, соли тяжелых металлов, радионуклиды, холестерин. Органические кислоты ягод, фруктов, плодов стимулируют сокоотделение в желудочно-кишечном тракте и улучшают пищеварение, активизируют перистальтику кишечника, уменьшая риск развития многих желудочно-кишечных заболеваний.

Во всех экстрактах листьев стевии определяли наличие органических кислот методом ВЭЖХ. Использовали колонку Altima C-18, 5 μ , 250мм x 4,6мм со скоростью потока 1мл/мин, (детектор УФ 210нм, элюент вода-метанол-ацетонитрил 99:0,5:0,5 об./об.) (табл. 2).

Таблица 2. Содержание органических кислот в экстрактах листьев стевии

	Органические кислоты	Концентрация, мг/мл			
		Почвы			
		Гидропоника	Арагатская равнина	Украина (Крым)	Нагорный Карабах (Аскеранский район)
1.	Аспарагиновая	3,66 $\pm$ 0,52	2,13 $\pm$ 0,27	0,93 $\pm$ 0,07	4,55 $\pm$ 0,03
2.	Щавелевая	14,59 $\pm$ 1,87	5,53 $\pm$ 0,54	3,84 $\pm$ 0,25	16,52 $\pm$ 1,64
3.	Винная	2,76 $\pm$ 0,42	2,23 $\pm$ 0,12	0,91 $\pm$ 0,09	3,46 $\pm$ 0,58
4.	Яблочная	45,96 $\pm$ 2,36	61,04 $\pm$ 3,82	13,52 $\pm$ 1,05	52,26 $\pm$ 3,48
5.	Лимонная	3,43 $\pm$ 0,26	-	0,21 $\pm$ 0,08	4,72 $\pm$ 0,57
6.	Фумаровая	0,02 $\pm$ 0,001	0,02 $\pm$ 0,001	0,008 $\pm$ 0,0005	0,008 $\pm$ 0,005

Исследования показали, что из четырёх типов изучаемых образцов листьев стевии наиболее продуктивным сырьем для получения сладких гликозидов являются листья растения, выращенного в Нагорном Карабахе, где выход дитерпеновых гликозидов составляет 83%.

Таким образом, предложен способ получения сухого порошка смеси дитерпеновых гликозидов из листьев стевии, который исключает использование токсичного метанола и высокотоксичного дорогостоящего хлороформа, благодаря чему он экологически более безопасен и экономически эффективен.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Քարախանյան Մ.Ա., Հովհաննիսյան Լ.Է., Պուլյան Ա.Ա. և ուրիշներ*. Նոր տեխնիկական մշակարարի՝ Ստերախոսի (*Stevia rebaudiana* Bertoni) ինտրոդուկցիան ՀՀ-ում և ԼՂՀ-ում, շահավետ հեռանկարային առաջարկ պետական և մասնավոր ներդրումների համար: ՀՀ Գյուղ. Նախ., Ագրոգիտություն, Երևան, 5-6, էջ 296-302, 2012.
2. Биологический энциклопедический словарь. Гл. ред. М.С. Гиляров. Редкол.: А.А. Баев, Г.Г. Винберг и др. М., 831 с., 1986.
3. *Зубцов В.А., Осипова Л.Л., Лебедева Т.И., Антипова Н.В.* Стевия – лекарственное и пищевое растение. Мат. I Межд. научно-практ. конф. “Растительные ресурсы для здоровья человека”. - 23-27 сент., 2002. М.,Сергиев-Пасад: “Арес”. сс. 356-358.
4. *Кедик С.А., Ярцев Е.И., Станишевская И.Е., Федоров С.В.* Технология получения сухого очищенного экстракта из листьев стевии. “Вестник МИТХТ”, 3, 2, сс. 79-83, 2008.
5. Латинская Америка: Энциклопедический словарь. М., I, сс. 479-480, 1980.
6. *Ляховкин А.Г., Николаева А.П., Учитель В.Б.* Стевия-медовая трава.С.-Петербург: “Весь”. 123 с., 1999.
7. *Семенова Н.* Стевия – растение XXI века. М., С.-Петербург. “Диля”, 160 с., 2004.
8. *Bondarev N., Reshetnyak O., Nosov A.* Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Science, 161, p.155-163, 2001.
9. *Chan P., Xu D.Y., Liu J.C., Chen Y.J., Tomlinson B., Huang W.P., Cheng J.T.* The effect of stevioside on blood pressure and plasma catecholamines in spontaneously hypertensive rats. Life Sci., - 63, 19, pp. 1679-1684, 1998.
10. *Chan P., Tomlinson B., Chen Yi-J., Liu Ju-C., Hsieh Ming-H., Cheng Juei-T.* A double-blind placebo controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. Bras. J. Clin. Pharmacol., 50, pp. 215-220, 2000.
11. *Crammer B., Ikan R.* Progress in the chemistry and properties of the rebaudioside. In: Grenby, T.B. Developments in Sweeteners. 3, London: Elsevier, p. 45-64, 1987.
12. *Jeppesen P.B., Gregersen S., Alstrup K.K., Hermansen K.* Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects *in vivo*: studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. Phytomedicine, 9, pp. 9-14, 2002.
13. *Kinghom A.D., Soejarto D.D.* Current status of stevioside as a sweetening agent for human use. In: Wagner H., Hikino H., Farnsworth N.R. Economic and medicinal plant research, I. L., Academic Press. pp. 1-52, 1985.
14. *Kinghom A.D., Kaneda N., Baek N.I., Kennelly E.J., Soejarto D.D.* Noncariogenic intense natural sweeteners. Med. Res. Rev., 18, 5, pp. 347-360, 1998.
15. *Kinghom A.D.* Overview In: Kinghom, A.D. Stevia, the genus Stevia, N.Y., Taylor and Francis. pp. 1-17, 2002.
16. *Nelson N.* A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem., 153, 2, pp. 375-380, 1944.
17. *Somogyi M.* Notes on sugar determination. J. Biol. Chem., 195, 1, pp. 19-23, 1952.
18. *Takahashi K., Matsuda M., Ohashi K., Taniguchi K., Nakagomi O., Abe Y., Mori S., Sato N., Okutani K., Shigeta S.* Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. Antiviral Res., 49, pp. 15-24, 2001.
19. *Yasukawa K., Kitanaka S., Seo S.* Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse. Skin Biol. Pharm. Bull., 25. 11, pp. 1488-490, 2002.

Поступила 03.04.2015



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

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1(68), 2016

ԱՂՍՏԵՎ ԵՎ ՀԱԽՈՒՄ ԳԵՏԵՐԻ ՓՈՔՐ ՀԻՂՈՒԼԵԿՏՐԱԿԱՅԱՆՆԵՐԻ ՁԿՆՈՒՂԻՆԵՐԸ ԵՎ ԴՐԱՆՑ ՆՇԱՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆԸ ՁԿՆԱՇԽԱՐՀԻ ՊԱՀՊԱՆՈՒԹՅԱՆ ՀԱՄԱՐ

Ս.Խ. ՊԻՊՈՅԱՆ¹, Ա.Ս. ԱՌԱՔԵԼՅԱՆ², Լ.Գ. ԳԱԼՍՅԱՆ³,
Ի.Ս. ԳԱԲԱՅԱՆ⁴

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

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

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

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

Ներկայացված է Աղստև և Հախում գետերի ու դրանց ավազանին պատկանող առանձին վտակների ձկնաշխարհի կազմը, ինչպես նաև նկարագրված են այդ գետերի վրա կառուցված փոքր հիդրոէլեկտրակայանների ջրառի հանգույցներում տեղակայված ձկնուղիները: Բացահայտվել է, որ վերոգրյալ ձկնուղիների էական մասը չի համապատասխանում այդ գետերում մշտաբնակ, ինչպես նաև պարբերաբար միգրացիաներ կատարող ձկնատեսակների կենսական պահանջմունքներին և ֆիզիկական հնարավորություններին: Իրավիճակը շտկելու համար առաջարկվում է շահագործել ձկնուղու նոր մոդել, ինչն էական ներդրում կարող է ունենալ գետերի ձկնային պաշարների և կենսաբազմազանության պահպանման գործում:

Ձկնուղիներ – ձկնաշխարհ – փոքր հիդրոէլեկտրակայաններ – Աղստև և Հախում գետեր

Представлен видовой состав рыбного населения некоторых рек бассейна р. Кура и их притоков на территории Республики Армения, дано описание рыбопропускных сооружений на малых ГЭС, построенных на этих водотоках. Выявлено, что основная часть этих сооружений не соответствует биологическим потребностям и физическим возможностям как оседлых, так и периодически мигрирующих рыб. Исходя из данной ситуации, предлагается эксплуатировать новую модель рыбопропускных сооружений, что может внести значимый вклад в сохранение биоразнообразия и рыбных запасов в изучаемых реках.

*Рыбопропускные сооружения – ихтиофауна – малые гидроэлектростанции –
реки Агстев и Ахум*

The paper presents the ichthyofauna of separate rivers and their tributaries that belong to Kura River basin and flow through the territory of Armenia. It also describes the fish ladder situated in water hubs of Small Hydropower Plants built on those rivers. It has been found that the majority of the above mentioned fish ladders do not meet the biological requirements and physical capabilities of both resident and migratory fish species of those rivers. On the basis of this situation it is expected to operate the new model fish ladders that can make a significant contribution to the conservation of biodiversity and fish stocks in the studied rivers.

Fish ladders – ichthyofauna – small Hydropower Plants – rivers Aghstev and Hakhum

Հիդրոէներգետիկան համարվում է վերականգնվող էներգետիկայի կարևորագույն ճյուղ, և այն ողջ աշխարհում համարվում է այլընտրանքային, էկոլոգիապես մաքուր ու բնապահպանական առումով քիչ ռիսկային: ՀՀ կառավարության 2014 թ. հուլիսի 31-ի 836-Ն որոշմամբ հաստատվել է «Հայաստանի Հանրապետության էներգետիկական անվտանգության ապահովման հայեցակարգի դրույթների իրականացումն ապահովող 2014-2020 թթ. միջոցառումների ծրագիր-ժամանակացույցը»: Վերոգրյալ հայեցակարգով Հայաստանի համար հրամայական է համարվել էներգիայի վերականգնվող աղբյուրների լայնածավալ օգտագործումն ու լիակատար ներառումը երկրի վառելիքաէներգետիկ հաշվեկշռի մեջ, որի ապահովման համար վերոգրյալ ծրագիր-ժամանակացույցով նախատեսվել են նաև հիդրոէլեկտրակայանների (ՀԷԿ) կառուցման միջոցառումներ: ՀՀ տարածքում արդեն գործում է 169 փոքր ՀԷԿ (ՓՀԷԿ), իսկ շուրջ 60-ը գտնվում են կառուցման փուլում: Ներկայում ՓՀԷԿ-երն արտադրում են ՀՀ-ում արտադրվող էլեկտրաէներգիայի պահանջարկի շուրջ 10 %-ը, ինչը գալիք տասնամյակի ընթացքում աճելու միտում է ունենալու [2]: Սակայն ՀՀ ՓՀԷԿ-երի գործունեության արդյունքում արդեն իսկ ի հայտ են եկել մի շարք խնդիրներ և խոչընդոտներ, որոնք մեծացնում են ՓՀԷԿ-երի ռիսկայնությունը բնապահպանական տեսանկյունից: Այսպես, մեր նախնական դիտարկումների համաձայն ՓՀԷԿ-երի ջրառի գլխամասային կառույցները, որտեղից գետի ջուրը մտնում է ճնշումային խողովակաշար և հոսում դեպի ՓՀԷԿ-երի թափանիվներ (տուրբիններ), գետի հունը սովորաբար պատնեշված է բետոնե կամ մետաղական պատվարով: Արդյունքում փոքր գետակների ջուրը լճանում է, իսկ ջրի էկոլոգիական թողքի սահմանված ծավալը և ձկնուղիների կառուցվածքը հաճախ չեն ապահովում գետում բնակվող ձկնատեսակների ու մյուս օրգանիզմների ազատ տեղաշարժը գետի մի հատվածից մյուսը: Բացի այդ, ՓՀԷԿ-երի ջրառի գլխամասային կառույցներում ձկնապաշտպան ցանցերի բացակայությունը կամ առկա աղբյուրից ցանցերի համեմատաբար մեծ ձեղքերը արգելք չեն հանդիսանում գետի վերին հոսանքում բնակվող ձկների, հատկապես մանրաձկների, հայտնվելուն ՓՀԷԿ-երի ճնշումային խողովակաշարերում և այնուհետև թափանիվներում, որտեղ նրանք ենթարկվում են մեխանիկական ամենատարբեր ազդեցությունների: Ինչպես վկայում են առանձին ուսումնասիրություններ, ՀԷԿ-երի տուրբինների միջով անցնելու ընթացքում նկատվում է ձկների թրթուրների և մանրաձկների զանգվածային ոչնչացում միայն լողափամփոշուի ճնշումային վնասվածքների արդյունքում [6]:

Ելնելով վերոգրյալից, մենք մեր առջև խնդիր ենք դրել նկարագրել Աղստև և Հախում գետերի ու դրանց ավազանին պատկանող առանձին վտակների վրա կառուցված ՓՀԷԿ-երի ձկնուղիները և ձկնապաշտպան այլ կառույցները՝ վերլուծելով դրանց նշանակությունը վերոնշյալ գետերում բնակվող ձկնատեսակների բնականոն կենսա-գործունեությունն ապահովելու համար, ինչն էլ հանդիսանում է սույն աշխատանքի նպատակը:

Նյութ և մեթոդ: Ուսումնասիրման համար նյութ են ծառայել մեր կողմից 1998-2015 թթ. ընթացքում Աղստև և Հախում գետերի ու դրանց ավազանին պատկանող ջրակայների վտակների ձկնաշխարհի կազմի ուսումնասիրությունները, որոնց ընթացքում 1.5 մ բռնակ և 0.5 մ տրամագիծ ունեցող ձեռքի ձկնորսական ցանցի, 0.8 մ տրամագիծ ունեցող վերհան ցանցի և ձկնորսական կարթերի օգնությամբ որսվել են 15 ձկնատեսակի պատկանող 642 առանձնյակ: Ձկների որսի, դրանց մշակման և տեսակային որոշումների ընթացքում պահպանվել են ձկնաբանության մեջ ընդունված մեթոդները [4, 5]: Բացի վերոգրյալից, 2015 թ. մայիս-օգոստոսի ընթացքում մոնիթորինգային դիտարկումներ են իրականացվել Աղստև գետի վրա կառուցված «Աղստև 1», Գետիկ գետի ու նրա առանձին վտակների վրա կառուցված «Էրիկ», «Գոշ», «Խաչարձան», և Հախում գետի վրա կառուցված «Սիրարփի» ՓՀԷԿ-երում: Դիտարկումների ընթացքում առանձնակի ուշադրություն է դարձվել ՓՀԷԿ-երի ջրառ հանգույցներում ձկնապաշտպան կառուցվածքների (ձկնուղի, ձկնա-պաշտպան ցանց) առկայությանը և գնահատվել է դրանց համապատասխանությունը երաշխավորված չափանիշներին ու տվյալ գետում բնակվող ձկնատեսակների ֆիզիկական և կենսաբանական պահանջմունքներին [1, 2, 4]:

Արդյունքներ և քննարկում: Աղստև և Հախում գետերն ընդհանուր առմամբ հարուստ չեն ձկնատեսակներով: Համաձայն նախկինում կատարված ուսումնասիրությունների, այստեղ է հանդիպում Հայաստանի ջրակայներում գրանցված շուրջ 40 ձկնատեսակներից 15-ը [3, 4]: Էլ ավելի քիչ ձկնատեսակներ են հանդիպում այն տեղամասերում, որտեղ կառուցված են դիտարկվող ՓՀԷԿ-երի մեծ մասի ջրառի գլխամասային կառույցները: Այսպես, Աղստև գետի այն հատվածում, որտեղ կառուցված է «Աղստև 1» ՓՀԷԿ-ի ջրառ հանգույցը (կոորդինատները՝ 44°44'20.5"E-40°42'58.6"N, ծովի մակարդակից բարձրությունը՝ 1630 մ, ճնշումային խողովակաշարի երկարությունը՝ 5428 մ), հանդիպում են կարմրախայտը

Salmo trutta fario L., 1758, Կուրի բեղաձուկը *Barbus cyri* De Filippi, 1865, արևելյան տառեխիկը *Alburnoides eichwaldii* (De Filippi, 1863), Սևանի կողակը *Capoeta sevangi* De Filippi, 1865: ՓՀԷԿ-ի ջրառ հանգույցում առկա է 20.5 մ երկարությամբ, 1.64 մ լայնությամբ (ամենաստորին մասում) և 10 առանձին հատվածներից կազմված բետոնե ձկնուղի: Այն կառուցված է կիսալաբիրինթոսային մոդելի հիման վրա: Նման կառուցվածքը բավարար է գետում բնակվող համեմատաբար խոշոր և միջին չափերի ձկների՝ կարմրախայտի, Սևանի կողակի գաղթի համար, սակայն որոշ դժվարություններ կարող է հարուցել ավելի մանր ձկնատեսակների՝ Կուրի բեղաձկան և արևելյան տառեխիկի գետի մի հատվածից մյուսը տեղափոխվելու ընթացքում: Դիտարկումների ընթացքում այս ՓՀԷԿ-ի ջրառի գլխամասային կառույցում ձկնապաշտպան ցանցը բացակայում էր: Այստեղ առկա է նաև մեկ այլ խնդիր, ինչը վերաբերում է գետի հունով հոսող ջրին: Դիտարկման պահին (հունիսի 14, 2015 թ.) գետի նախկին հունը ջրառից հետո համարյա թե լրիվ չորացած էր, իսկ ձկնուղով հոսող ջուրը բավարար ծավալներ չէր կարող ապահովել գետի ստորին հոսանքից դեպի վեր ձվադրման բարձրացող ձկնատեսակների միգրացիոն բնագոյն արթնացնելու համար:

Աղստև գետի վտակ հանդիսացող Գետիկ գետի վերին հոսանքում, որտեղ կառուցված է «Էրիկ» ՓՀԷԿ-ի ջրառ հանգույցը (կոորդինատները՝ 45°15'25.41"E - 40°39'51.48"N, ծովի մակարդակից բարձրությունը՝ 1668 մ, ճնշումային խողովակաշարի երկարությունը՝ 2050 մ), հանդիպում են կարմրախայտը, Կուրի բեղաձուկը, Սևանի կողակը, արևելյան տառեխիկը: Գետի ավերին կառուցված ձկնային տնտեսություններից այստեղ պարբերաբար հայտնվում է նաև ծիածնախայտը *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972): Ձկների տեղաշարժն ապահովելու համար ՓՀԷԿ-ի ջրառ հանգույցում կառուցված է բետոնե ձկնուղի՝ 11.2 մ երկարությամբ և 1.20 մ լայնությամբ: Ձկնուղին կազմված էր 170 սմ երկարություն ունեցող 5 առանձին հատվածներից, որոնք իրար հետ հաղորդակցվում են 20 սմ լայնություն և մոտ 25 սմ բարձրություն ունեցող ճեղքերով: Ջրառ հանգույցում բացակայում է ձկնապաշտպան ցանցը, որի փոխարեն առկա է ճաղավանդակային աղբորսիչ: Վերոգրյալ ձկնապաշտպան կառուցվածքների առանձնահատկությունները լիարժեք չեն ապահովում գետում բնակվող ձկների բնականոն տեղաշարժը գետի հոսանքն ի վեր, իսկ աղբորսիչի ճաղավանդակների վրա տնականորեն հավաքված աղբը և կենցաղային այլ թափոնները բացասական են ազդում վերին բիեֆի ջրի որակի վրա՝ անբարենպաստ պայմաններ ստեղծելով այդտեղ հանդիպող ձկնատեսակների, հատկապես դրանց մանրաձկների բնականոն կենսագործունեության համար:

Գոշ գյուղի միջով հոսող Գետիկ գետի Գոշ վտակի վրա գործում է «Գոշ» ՓՀԷԿ-ը, որի ջրառ հանգույցը (կոորդինատները՝ 45°0'1.09"E-40°43'44.41"N, ծովի մակարդակից բարձրությունը՝ 1188 մ, ճնշումային խողովակաշարի երկարությունը՝ 2990 մ) գուրկ է ձկնուղուց և ձկնապաշտպան ցանցից: Այս հանգամանքը ՓՀԷԿ-ի շահագործողները բացատրում են նրանով, որ Գոշի ստորին և միջին հոսանքում առկա են բնական ջրվեժներ ու սահանքներ, ինչպես նաև բետոնապատ կառույցներ, որոնց պատճառով որևէ ձկնատեսակ չի կարող բարձրանալ գետի հունով ի վեր: Հարկ է նշել, որ Գոշն իր ջրակենսաբանական առանձնահատկություններով համապատասխանում է կարմրախայտի բնակեցման պահանջներին և համապատասխան ձկնուղիներ կառուցելու ու դրանք շահագործելու դեպքում այդ ձկնատեսակը կարող է բնակեցնել Գոշ գետի վերին հոսանքները:

«Դիլիջան» ազգային պարկի տարածքով հոսող Գետիկ գետի Խաչարձան վտակի վրա գործում է «Խաչարձան» ՓՀԷԿ-ը: Վտակում հանդիպում են կարմրախայտը, Կուրի բեղաձուկը, արևելյան տառեխիկը: ՓՀԷԿ-ի ջրառ հանգույցում (կոորդինատները՝ 45°02'36.8"E-40°41'44.9"N, ծովի մակարդակից բարձրությունը՝ 1144 մ, ճնշումային խողովակաշարի երկարությունը՝ 1740 մ) առկա է 9 աստիճաններից բաղկացած բետոնե ձկնուղի՝ 11.20 մ երկարությամբ, 1.10 մ լայնությամբ և մինչև 1.5 մ բարձրությամբ: Գետի հոսանքով դեպի վեր բարձրացող ձկները պետք է հաղթահարեն առնվազն 50 սմ բարձրություն ունեցող առաջին աստիճանը, իսկ հետո՝ մինչև 30 սմ բարձրություն ունեցող ութ աստիճանաձև սահանքներ: Ձկնուղու նման կառուցվածքը լրացուցիչ դժվարություններ է ստեղծում գետում բնակվող ձկների, հատկապես փոքր չափեր ունեցողների՝ Կուրի բեղաձկան և արևելյան տառեխիկի համար: Միաժամանակ այստեղ առկա է մանր՝ 1-1.5 սմ տրամագիծ ունեցող անցքերով աղբորսիչ, ինչը կարող է նաև ձկնապաշտպան ցանցի դեր կատարել:

Հախում գետի այն հատվածում, որտեղ կառուցված է «Սիրարփի» ՓՀԷԿ-ի ջրառ հանգույցը (կոորդինատները՝ 45°19'14.58"E-40°55'40.83"N, ծովի մակարդակից բարձրությունը՝ 810 մ, ճնշումային խողովակաշարի երկարությունը՝ 2700 մ), հանդիպում են կարմրախայտը, Կուրի բեղաձուկը, արևելյան տառեխիկը, Սևանի կողակը, արծաթափայլ կարասը *Carassius gibelio* (Bloch, 1782): ՓՀԷԿ-ի ջրառ հանգույցում առկա է անհարթ գետաքարերով սալարկված 6.7 մ երկարությամբ և 1.1 մ լայնությամբ բետոնե ձկնուղի:

Ձկնուղու նման կառուցվածքը բավարար է գետում բնակվող ձկների բնականոն տեղաշարժի ապահովման համար: Առկա է նաև աղբորսիչ ցանց, որն անմիջապես գտնվում է ճնշումային խողովակատարի մուտքի վրա: Ցանկալի կլիներ, որ նման աղբորսիչ ցանց դրվեր նաև բետոնից կառուցված ջրատարի սկզբում, ինչը ձկնապաշտպան ցանցի փոխարեն թույլ կտար պահպանել առավել մեծ թվով մանրաձկների:

Աղստև և Հախում գետերի ու դրանց վտակների հունի վրա կառուցված առանձին ՓՀԿ-երի ձկնուղիների տեսակների և կառուցվածքային լուծումների վերլուծությունը ցույց է տալիս, որ ձկնուղիների էական մասը չի համապատասխանում այդ գետերում բնակվող և/կամ պարբերաբար միգրացիաներ կատարող բոլոր ձկնատեսակների կենսական պահանջմունքներին ու ֆիզիկական հնարավորություններին [2]: Այդ իմաստով դրանք մեծամասամբ ինքնանպատակ են ու չեն համապատասխանում նմանատիպ կառույցների նկատմամբ ժամանակակից պահանջներին, ինչն էլ հանդիսանում է դրանց ոչ լիարժեք գործելու հիմնական պատճառը: Վերոգրյալ խնդիրը լուծելու համար առանձին հետազոտողների կողմից մշակվել է լաբիրինթոսային տիպի ձկնուղու նոր մոդել, որտեղ հաշվի են առնված Հայաստանի ձկնատեսակների մարմնի առավելագույն չափերը և ջրակայների տեղաբաշխման առանձնահատկությունները [1]: Նման մոդելի հիման վրա կառուցված ձկնուղիները կարող են իրենց էական ներդրումն ունենալ գետերի ձկնային պաշարների և կենսաբազմազանության պահպանման գործում: Միաժամանակ անհրաժեշտ է Հայաստանի գետերի կենսաբազմազանության և ձկնային պաշարների մոնիթորինգային ուսումնասիրությունների կազմակերպում՝ ՓՀԿ-երի գործունեության հնարավոր ազդեցությունները ճշգրտելու և ժամանակին համապատասխան միջոցառումներ մշակելու ու իրականացնելու նպատակով:

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

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Մամվեյան Ա.Լ. Փոքր հիդրոէլեկտրակայանների ձկնուղի կառուցվածքների ինժեներական ապահովումը լեռնային պայմաններում: Սեղմագիր տեխնիկական գիտ. թեկն. գիտ. աստ. հայցման համար ատենախոսության, Երևան, 22 էջ, 2015:
2. Մամվեյան Ա.Լ., Գաբայան Գ.Ս., Պիպյան Մ.Խ. ձկնատեսակների մարմնի չափերը որպես ձկնուղի կառուցվածքի չափերը որոշող գործոն. Ճարտարապետության և շինարարության Հայաստանի ազգային համալսարանի տեղեկագիր, 44, 6, էջ 31-38, 2014:
3. Левин Б.А., Рубенян А.Р. О новых ихтиологических находках в Армении. Российский журнал биологических инвазий. 1, с. 39-45, 2012.
4. Пипоян С.Х. Ихтиофауна Армении: этапы формирования и современное состояние. ISBN 978-3-8473-9977-3, с. 548, 2012.
5. Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб. М.: Пищ. пром-сть, 376 с., 1966.
6. Редкие и исчезающие животные. Рыбы: Справ. пособие. Павлов Д.С., Савваитова К.А., Соколов Л.И., Алексеев С.С.; под ред. В.Е. Соколова. М., Высш. шк., 334 с., 1994.

Ստացվել է 18.09.2015



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

Биол. журн. Армении, 1 (68), 2016

**ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА АМИДИРОВАННОСТЬ
БЕЛКОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ СТАРЕНИИ**

И.А. БАДАЛЯН, С.В. АРУТЮНЯН

*Ереванский госуниверситет, кафедра биохимии
badalyania@mail.ru*

Исследовались амидированность белков головного мозга интактных и подвергнутых гипоксии молодых и старых крыс, а также изменение содержания амидных групп белков при инкубировании гомогенатов головного мозга. Показано, что при старении снижается амидированность белков мозга за счет легкогидролизуемой фракции. В условиях гипоксии происходит свойственное процессам торможения амидирование белков мозга, причем у старых крыс в большей степени, чем у молодых. В течение трехчасовой инкубации гомогенатов в обеих возрастных группах наблюдалось дезамидирование белков, происходящее за счет легкогидролизуемых амидных групп белков мозга.

Гипоксия – амидные группы белков – легко- и трудногидролизуемые амидные группы

Ուսումնասիրվել է գլխուղեղի սպիտակուցների ամիդացումն ինտակտ ու հիպոքսիայի ենթարկված երիտասարդ և ծեր առնետների մոտ, ինչպես նաև սպիտակուցների ամիդային խմբերի պարունակության փոփոխությունը գլխուղեղի հոմոգենատներն ինկուբացելիս: Ցույց է տրված, որ ծերացման ժամանակ նվազում է գլխուղեղի սպիտակուցների ամիդացման աստիճանը՝ ի հաշիվ հեշտ հիդրոլիզվող ֆրակցիայի: Հիպոքսիայի պայմաններում տեղի է ունենում արգելակման գործընթացներին բնորոշ գլխուղեղի սպիտակուցների ամիդացում, ընդ որում ծեր առնետների մոտ ավելի մեծ չափով, քան երիտասարդների մոտ: Հոմոգենատների երեքժամյա ինկուբացման ընթացքում երկու տարիքային խմբերում էլ դիտվում էր սպիտակուցների դեզամիդացում՝ գլխուղեղի սպիտակուցների հեշտ հիդրոլիզվող ամիդային խմբերի հաշվին:

*Հիպոքսիա – սպիտակուցների ամիդային խմբեր –
հեշտ և դժվար հիդրոլիզվող ամիդային խմբեր*

Brain protein amidation of intact and hypoxia impscted young and old rats as well as changes in the content of protein amide groups during incubation of brain homogenates have been studied. It is shown that at aging brain proteins amidation level decreases at the expense of weak hydrolysable fraction. Under hypoxia conditions the amidation of brain proteins takes place, which is typical for inhibition processes, furthermore, in case of old rats, the amidation level is more than in case of the young ones. During three hours incubation of homogenates in both age groups it is observed deamidation of proteins at the expense of weak hydrolysable amide groups of brain proteins was observed.

Hypoxia – protein amide groups – weak and hard hydrolyzable amide groups

В механизмах аммиакообразования и обезвреживания аммиака определенная роль приписывается амидным группам (АГ) белков тканей. Предполагалось, что при инкубации гомогенатов тканей в процессе интенсивного аммиакообразования, наряду с известными источниками, принимают участие и амидные группы белков. Однако было показано, что при инкубации гомогенатов головного мозга сумма амидных групп белков очищенного трихлоруксусного (ТХУ) осадка гомогената не претерпевает изменений, несмотря на наблюдаемое перераспределение между легко- и трудногидролизуемыми фракциями амидных групп, в результате чего было сделано заключение о непричастности амидных групп белков к процессу аммиакообразования при инкубировании гомогенатов [2].

Неоспоримым фактом является изменение амидированности белков головного мозга в зависимости от функционального состояния организма, а также его реакций на действие экстремальных факторов окружающей среды. Доказано, что процессы возбуждения, протекающие в мозге животных, вызывают, наряду с интенсивным расходом энергетических субстратов, также расщепление амидных групп белков головного мозга. Так, дезамидирование белков головного мозга наблюдается при электрическом возбуждении [7], при гипероксии [9], при алкогольной интоксикации [4], в постреанимационном периоде [10], в результате введения в организм инсулина, камфоры [7]. При развитии же тормозных процессов в мозгу – во время естественного сна, зимней спячки, акклиматизации животных к холоду [5], при действии вибрации [13], гипоксии [3], введении нембутала и мексидала [7], наоборот, происходит амидирование белков ткани.

Целью настоящей работы являлось изучение амидированности белков головного мозга при старении, а также влияние гипоксии на амидные группы белков старых крыс и их динамику при инкубировании гомогенатов тканей.

Материал и методика. Исследования проводили на молодых (4-6 мес.) и старых (24 мес.) белых крысах в нормальных условиях и условиях гипоксии, созданных в барокамере с давлением 335 мм рт. ст., соответствующее высоте 6 км над уровнем моря, с кратковременной выдержкой в течение 20 мин животных на этой высоте. Сразу после спуска животных подвергали декапитации, готовили гомогенат мозга в 0.05 М К-фосфатном буфере, pH=7.4. До и после трехчасовой инкубации гомогенатов в ТХУ-осадках, очищенных от азотсодержащих соединений и липидов, определяли белковый амидоазот методом жесткого кислотного гидролиза по количеству выделившегося аммиака. При определении суммы амидных групп (САГ) осадки подвергались гидролизу в 1 N H₂SO₄ в течение 180 мин, при определении легкогидролизуемых амидных групп (ЛАГ), принадлежащих аспарагину, – 30 мин. Трудногидролизуемые амидные группы (ТАГ), принадлежащие глутамину, определяли по разности САГ и ЛАГ [11]. Содержание аммиака определяли микродиффузионным методом Зелингсона в модификации Силаковой [12]. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В процессе старения организма происходит изменение свойств белков, в том числе и мозга, в результате программы синтеза или посттрансляционных модификаций, которые должны затронуть наиболее лабильные функциональные группы, участвующие в трансконформационных изменениях белков. К числу функциональных групп, играющих важную роль в формировании структуры и активных центров белков, относятся амидные группы.

Результаты наших исследований по содержанию амидных групп белков мозга крыс при старении, а также динамика амидных групп при трехчасовой инкубации гомогенатов мозга приведены в табл. 1.

Согласно приведенным данным, САГ белков мозга старых крыс составляет 20,5 мкМ/г, что свидетельствует о снижении содержания амидных групп на 5,13 мкМ/г по сравнению с молодыми животными. Также выявлено снижение содержания ЛАГ на 3,46 мкМ/г и ТАГ на 1,67 мкМ/г. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при старении организма происходит снижение амидированности белков головного мозга почти на 20 % и это уменьшение обуславливается в большей степени за счет ЛАГ, принадлежащих аспарагину. Уменьшение содержания амидных групп в белках ряда тканей в процессе старения показано и другими авторами [1, 6, 8].

Таблица 1. Содержание амидного азота белков головного мозга молодых и старых крыс до и после трехчасовой инкубации гомогенатов (мкМ/г свежей ткани, n=8, p<0.05)

Условия опыта	Сумма амидных групп (САГ)			Легкогидролизуемые амидные группы (ЛАГ)			Трудногидролизуемые амидные группы (ТАГ)		
	И н к у б а ц и я								
	До	После	Разность	До	После	Раз- ность	До	После	Разность
Молодые	25.63± 1.03	25.75± 1.01	0.12	14.75± 1.38	18.0± 1.53	3.25	10.88± 1.12	7.55± 0.89	-3.33
Старые	20.50± 1.12	20.12± 1.10	-0.38	11.29± 1.04	9.07± 1.20	-2.22	9.21± 1.32	11.05± 1.19	1.84
Сниже- ние со- держ. АГ	5.13			3.46			1.67		

При трехчасовой инкубации гомогенатов мозга старых крыс получены следующие данные: содержание САГ белков до и после инкубации остается без изменений – 20,50 мкМ/г до и 20,12 мкМ/г после инкубации. Наблюдается перераспределение амидных групп между ЛАГ и ТАГ: ЛАГ уменьшается на 2,22 мкМ/г, тогда как ТАГ увеличивается на 1,84 мкМ/г. Перераспределение между фракциями амидных групп при различных функциональных состояниях мозга в результате транс-конформационных изменений белков было отмечено рядом авторов [10]. Из приведенных нами данных видно, что как в случае с молодыми, так и со старыми крысами при инкубировании гомогенатов мозга прослеживается та же динамика, что свидетельствует о том, что при старении организма амидные группы белков мозга также не участвуют в процессах аммиакообразования при инкубации гомогенатов.

Результаты исследований по влиянию гипоксии на амидированность белков мозга старых крыс приведены в табл. 2.

Согласно полученным данным, под действием гипоксии происходит амидирование белков мозга, свойственное процессам торможения. САГ белков в условиях гипоксии увеличивается до 28,02 мкМ/г, по сравнению с содержанием амидных групп интактных старых крыс (на 7,52 мкМ/г). Значительное увеличение амидированности наблюдается в легкогидролизуемой фракции белков (16,91 мкМ/г), и превосходит ее содержание в нормальных условиях на 5,62 мкМ/г. В трудногидролизуемой фракции увеличение содержания амидных групп происходит лишь на 1,9 мкМ/г. Результаты представленной серии свидетельствуют о том, что под воздействием гипоксии увеличение амидных групп белков

мозга старых крыс также как и молодых [3] происходит за счет легкогидролизуемой фракции белков.

При инкубировании гомогенатов мозга старых крыс, подвергнутых гипоксии, выяснилось, что амидированность белков не остается неизменной, как в случае с интактными животными, а снижается на 3,02 мкМ/г. Однако происходящее дезамидирование белков гомогенатов мозга старых крыс происходит не так интенсивно, как в гомогенатах мозга молодых крыс, и амидированность белков после инкубации не спускается до уровня интактных крыс, как это наблюдалось в экспериментах с молодыми животными [3]. Происходящее дезамидирование белков при инкубации гомогенатов происходит за счет ЛАГ – 2,88 мкМ/г, при этом уровень ТАГ почти не меняется.

Таблица 2. Содержание амидного азота белков головного мозга старых интактных и подвергнутых гипоксии крыс (мкМ/г свежей ткани, n=8, p<0.05)

Условие опыта	Сумма амидных групп (САГ)			Легкогидролизуемые амидные группы (ЛАГ)			Трудногидролизуемые амидные группы (ТАГ)		
	И н к у б а ц и я								
	До	После	Разница	До	После	Разница	До	После	Разница
Интактные	20.50±1.12	20.12±1.10	-0.38	11.29±1.04	9.07±1.20	2.22	9.21±1.32	11.05±1.19	1.84
Подвергнутые гипоксии	28.02±1.38	25.0±1.25	-3.02	16.91±1.02	14.03±0.97	-2.88	11.11±1.09	10.97±1.12	-0.14
Снижение со-держ. АГ	7,52			5.62			1.9		

На основании приведенных данных можно заключить, что при старении уровень амидированности белков головного мозга крыс снижается. В условиях гипоксии в мозгу старых крыс наблюдается амидирование белков, свойственное процессам торможения. При инкубировании гомогенатов мозга крыс, подвергнутых гипоксии, отмечено, что дезамидирование белков мозга старых крыс происходит в меньшей степени, нежели у молодых. Существенно, что во всех случаях наблюдаемые изменения амидированности белков мозга происходят за счет ЛАГ, принадлежащих аспарагину.

ЛИТЕРАТУРА

1. Априкян Г.В., Мкртчян Г.А., Паронян Ж.А. Субклеточное распределение амидных групп белков мозга при старении. *Нейрохимия*, 1, 3, с. 243-247, 1982.
2. Бадалян И.А., Давтян М.А. Амидные группы белков и аммиакообразование в головном мозгу крыс. *Нейрохимия*, 1, 4, с. 384-390, 1986.
3. Бадалян И.А., Дилбарян А.С., Давтян М.А. Амидированность белков головного мозга крыс при гипоксии. Доклады НАН РА, 113, 4, с 391-395, 2013.
4. Векслер И.Я., Магомедова К.М. Амидные группы белков головного и спинного мозга при острой и хронической алкогольной интоксикации. *Укр. биохим. ж.*, 53, 3, с. 7-12, 1981.
5. Готлобер И.В. Амидные группы и аминокислоты белков мозга акклиматизированных к холоду крыс при последующих стрессовых

-
- воздействиях. В кн.: Материалы III Сев.-Кав. биохим. конф. Ростов-на-Дону, Изд-во РГУ, с. 94-95, 1976.
6. *Дурканаева О.А.* Амидированность и окислительные модификации белков тканей крыс и сывороточного альбумина при модельном и физиологическом старении. Дис. канд. биол. наук, Ростов-на-Дону, 2012.
 7. *Кометиани П.А., Клейн Е.Э., Гоциридзе Е.Г., Алексидзе Н.Г.* О белках головного мозга, чувствительных к ингибиторам памяти, и белках, содержащих метаболически активный амидный азот. 5-ая Всесоюзн. конф. по нейрохимии, Тбилиси, Изд-во Мецниереба, с. 87-101, 1970.
 8. *Кричевская А.А., Лукаш А.И., Пушкина Н.В., Шепотиновская И.В.* Роль посттрансляционного дезамидирования белков в процессе старения. 4-ая Закавказская конф. геронтологов и гериатров, Ереван, с. 52-54, 1980.
 9. *Новикова Е.И.* Действие гипероксии на белки сыворотки крови и мозга крысы. Деп. в ВИНТИ 12 августа, № 3555-80, 1980.
 10. *Папян А.А.* Амидные группы белков мозга при умирании и оживлении организма. Журн. exper. и клинич. медицины, 14, 5, с. 28-32, 1974.
 11. *Пушкина Н.В., Лукаш А.И.* Легко- и трудногидролизуемые амидные группы в белках. Известия Сев.-Кав. научн. центра высш. шк. Естеств. Науки, 2, с. 95-97, 1976.
 12. *Силакова А.И., Труш Г.П., Являкова А.* Микрометод определения аммиака и глютамина в тканевых трихлоруксусных экстрактах. Вопр. мед. химии, 8, 5, с. 538-544, 1962.
 13. *Симонян Л.П., Папян К.М., Бадалян И.А.* Влияние вибрации на аммиакообразование в мозгу крыс. Материалы республиканской молодежной научн. конф. "Экологическая наука в Армении", с. 146-153, 2001.

Поступила 20.10.2015



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1(68), 2016

ՕՐԳԱՆԻԶՄԻ ԻՆՏԵԳՐԱՏԻՎ ԴԱՇՏԻ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆԸ ԹԹՎԱԾՆԱՔԱՂՅԻ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Մ.Ա. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Ն.ՅՈՒ. ԱԴԱՄՅԱՆ

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

Օրգանիզմներում ֆիզիկաքիմիական գործընթացներին զուգահեռ ձևավորվում են նաև տարբեր բնույթի ինֆորմացիոն ազդանշաններ, որոնք օրգանիզմի տարբեր մակարդակների ֆունկցիոնալ համակարգերի (մոլեկուլային, բջջային, հյուսվածքային, օրգանային) փոխազդեցության արդյունք են: Այդ ազդանշանները օրգանիզմի մակերևույթին որոշակի ինտեգրատիվ դաշտ են առաջացնում, որը հնարավոր է գրանցել հատուկ սարքի՝ «Բիոսկոպի» միջոցով: Հիպօքսիկ ազդեցության դինամիկայում՝ տարբեր «բարձրությունների» վրա թթվածնի մասնական ճնշման փոփոխություններին համապատասխան, փոխվում է նաև օրգանիզմի ֆունկցիոնալ վիճակը, հետևաբար, նաև նրա շուրջը ձևավորվող վերոնշյալ դաշտի բնութագիրը, որը կարող է հանդիսանալ այլընտրանքային ոչ կոնտակտային միջոց կենսաբանական համակարգերի ֆունկցիոնալ վիճակների գնահատման համար:

Թթվածնաքաղց – «Բիոսկոպ» – ինտեգրատիվ դաշտի ազդանշան

В живых организмах параллельно с происходящими физико-химическими процессами формируются информационные сигналы различной природы. Эти сигналы образуются в результате взаимодействия функциональных систем организма разных уровней. В данном исследовании изучены изменения показателей интегративного сигнала, регистрируемого на поверхности тела животного в условиях острого гипоксического воздействия на организм с помощью специально разработанной аппаратуры “Биоскоп”. Результаты опытов показали, что данный сигнал очень чувствителен к такому стрессогенному фактору, как гипоксия.

Кислородная недостаточность – “Биоскоп” – интегративный сигнал

We studied the influence of hypoxia on the organism’s integrative signal registered on the surface of rats body using the apparatus complex “Bioscope”. This signal is generated as a result of interaction between organism’s functional systems of different levels. The experiment results suggest that the integrative signal is sensitive at oxygen deficiency conditions.

Hypoxia – “Bioscope” – integrative signal

Օրգանիզմի ինտեգրատիվ դաշտը ձևավորվում է մոլեկուլների, բջիջների, հյուսվածքների, օրգանների և օրգան-համակարգերի փոխազդեցության արդյունքում:

Ֆիզիոլոգիական տարբեր վիճակներում այդ փոխազդեցությունների և նշված համակարգերի միջև առաջացած կապերը որոշակի փոփոխությունների են ենթարկվում, օրգանիզմում տարբեր հարմարվողական և փոխհատուցողական մեխանիզմներ ձևավորելու նպատակով [3, 5, 8]: Այդ մեխանիզմների ձևավորման գործընթացները ցայտուն արտահայտվում են հատկապես ծայրահեղ իրավիճակներում, այդ թվում նաև թթվածնային անբավարարության տարբեր աստիճանների պայմաններում: Սույն հետազոտության նպատակն է բացահայտել օրգանիզմի ինտեգրատիվ դաշտի փոփոխությունների օրինաչափությունները թթվածնաքաղցի դինամիկայում:

Նյութ և մեթոդ: Փորձերը կատարվել են 150-200 գ քաշով սպիտակ առնետների վրա: Փորձերում առնետների ֆիզիոլոգիական վիճակը գնահատվել է «Բիոսկոպի» միջոցով: Համաձայն մշակված ծրագրի՝ գրանցվող տվյալները հիշվում են ՅBM- ում հետագա վերլուծության համար: Առնետների և «Բիոսկոպի» միջև հեռավորության (10-15 մմ) անփոփոխ պահպանման համար կենդանիները տեղադրվել են հատուկ վանդակում, իսկ հետո ճնշախցում: Գրանցվող ազդանշանների վերլուծությունը կատարվել է «Origin-8» ծրագրային փաթեթի կիրառմամբ: Ֆուրեի արագ ձևավորման մեթոդով գնահատվել է «Բիոսկոպի» ազդանշանների սպեկտրային խտությունը [12, 13]:

Յուրաքանչյուր փորձի սկզբում կատարվել է կենդանու ֆունկցիոնալ վիճակի երկժամյա ստուգիչ գրանցում, որից հետո առնետը 30 րոպե ենթարկվել է հիպոքսիկ ազդեցության: Ընշախցում անթթվածնային վիճակ ստեղծվել է օդամղիչ պոմպի միջոցով օդի դուրս մղման ճանապարհով: Ուսումնասիրվող ցուցանիշների գրանցումը կատարվել է մինչև կենդանիների «բարձրացումը» նորմոքսիայի պայմաններում ($PO_2 = 142$ մմ. սնդ. ս.), չափավոր հիպոքսիայի պայմաններում՝ 4000 մ «բարձրության» վրա ($PO_2 = 95-85$ մմ. սնդ. ս.), սուր հիպոքսիայի պայմաններում՝ 6000 մ «բարձրության» վրա ($PO_2 = 64-58$ մմ. սնդ. ս.) և «իջեցումից» հետո՝ նորմալ մթնոլորտային ճնշման պայմաններում: Ընշախցում կենդանիների «բարձրացումը» և «իջեցումը» կատարվել է 15-20 մ/վ արագությամբ: Հիպոքսիկ ազդեցությունից հետո երկու ժամվա ընթացքում շարունակվել է կենդանու հետաքրքեսային վիճակի գրանցումը:

Արդյունքներ և քննարկում: Հայտնի է, որ թթվածնաքաղցի պայմաններում փոխվում են օրգանիզմի բոլոր ֆունկցիաները [1, 2, 6, 7, 14]: Բնականաբար, այդ պայմաններում փոխվում է նաև օրգանիզմի ընդհանուր վիճակը: Օրգանիզմի հիերարխիկ տարբեր մակարդակների ցուցանիշները գումարային ձևով արտահայտվում են «Բիոսկոպի» գրանցած ազդանշաններում և ցույց են տալիս օրգանիզմի ֆիզիոլոգիական ակտիվության մակարդակը: Օրինակ, թմրեցված կենդանիների վրա կատարված փորձերից պարզվել է, որ նեմբութալի մահացու չափաբաժին ներարկելուց հետո փոքրանում է գրանցվող ազդանշանի միջին արժեքը: Դա թույլ է տալիս ենթադրելու, որ «Բիոսկոպի» ցուցանիշը արտահայտում է հետազոտվող օբյեկտի կենսաբանական ակտիվության պայմանական մակարդակը: Հետևաբար, այդ ցուցանիշի տատանասահմանի շեղումից (ստուգիչ մակարդակի) կարելի է դատել օրգանիզմի ֆունկցիոնալ վիճակի մասին:

«Բիոսկոպի» միջոցով գրանցվել են 11 առաջնային և 5 երկրորդային ցուցանիշներ և համապատասխան համակարգչային ծրագրով ենթարկվել վերլուծության: Բոլոր առնետների մոտ միանման փորձերով սպեկտրային հզորության խտությունը (FFT) միջինացվել է: Հաշվարկվել է «Բիոսկոպի» ազդանշանների FFT-ի տարբեր հաճախության միջակայքերի միջին տվյալները: Ցուցանիշների բացատրությունը և թվային արժեքները ներկայացված են աղ. 1, 2, 3-ում:

Աղյուսակ 1. «Բիոսկոպի» ազդանշանների վիճակագրական ցուցանիշներ

N	Հապավումներ	Պարզաբանում
Առաջնային ցուցանիշներ		
1	<BB> (րոպե)	BB միջակայքերի միջին արժեքը
2	Std_BB (րոպե)	BB միջակայքերի տարաբաժանում(դիսպերսիա)
3	CV (%)	BB միջակայքերի վարիացիանների ցուցիչ
4	RMSDD_BB (րոպե)	Քառակուսի արմատ BB միջակայքերի հաջորդական զույգերի տարբերության քառակուսիների գումարից
5	Max-Min (րոպե)	BB միջակայքերի առավելագույն և նվազագույն արժեքների տարբերությունը
6	Max/Min	BB միջակայքերի առավելագույն և նվազագույն արժեքների հարաբերությունը
7	AM ₀ (%)	BB միջակայքերի հիստոգրերի մոդայի տատանասահմանը(ամպլիտուդան)
8	M ₀ (րոպե)	BB միջակայքերի հիստոգրերի մոդան
9	F_BB=1/<BB>	Ազդանշանների տատանման միջին հաճախությունը
10	FFT	«Բիոսկոպի» ազդանշանների հզորության սպեկտրալ խտությունը
11	FFT_BB	BB միջակայքերի հզորության սպեկտրալ խտությունը
Երկրորդային ցուցանիշներ		
12	$A=AM_0/(Max-Min)$	
13	$B=1/(M_0*(Max-Min))$	
14	$C=AM_0/(2*M_0*(Max-Min))$	
15	D-AM ₀ -ի նկատմամբ BB միջակայքերի ընդհանուր քանակը	
16	$E=AM_0/M_0$	

Աղյուսակ 2. Առնետների վրա կատարած փորձերի ցուցանիշների միջինացված բացարձակ արժեքները չափավոր հիպոքսիայի (4000 մ) պայմաններում

N	Ցուցանիշներ	նորմոքսիա	4000 մ	«իջեցում»
1	<BB> (րոպե)	0.27±0.06	0.22±0.03	0.22±0.03
2	Std_BB (րոպե)	0.22±0.06	0.14±0.03	0.21±0.03
3	CV (%)	77.1±7.9	61.2±4.3	97.7±8.1
4	RMSDD_BB (րոպե)	0.27±0.09	0.18±0.04	0.26±0.06
5	Max-Min (րոպե)	1.1±0.2	0.9±0.2	1.2±0.1
6	Max/Min	24.9±8.8	17.1±2.1	28.7±5.1
7	AM ₀ (%)	5.3±1.4	3.6±0.6	4.2±0.4
8	M ₀ (րոպե)	0.13±0.05	0.10±0.02	0.09±0.01
9	F_BB=1/<BB>	4.1±0.7	4.8±0.9	4.7±0.7
10	FFT	0.07±0.02	0.08±0.01	0.09±0.01
11	FFT_BB	0.057±0.025	0.031±0.019	0.058±0.031
12	A	5.0±1.0	4.8±1.5	3.4±0.1
13	B	11.5±3.7	19.6±8.8	9.4±1.5
14	C	24.9±7.3	30.7±14.0	19.2±1.5
15	D	23.9±5.5	33.0±5.3	25.8±1.4
16	E	47.4±8.2	37.9±4.1	46.1±2.6

Աղյուսակ 3. Առնետների վրա կատարած փորձերի ցուցանիշների միջինացված բացարձակ արժեքները սուր հիպոքսիայի (6000 մ) պայմաններում

N	Ցուցանիշներ	նորմոքսիա	6000 մ	«իջեցում»
1	<BB> (րոպե)	0.19±0.02	0.14±0.02	0.17±0.02
2	Std_BB (րոպե)	0.12±0.01	0.09±0.01	0.15±0.02
3	CV (%)	63.6±5.7	64.6±4.0	89.1±9.8
4	RMSDD_BB (րոպե)	0.13±0.01	0.12±0.02	0.14±0.01
5	Max-Min (րոպե)	0.61±0.07	0.59±0.08	0.90±0.15
6	Max/Min	15.2±2.2	19.8±3.3	31.1±7.5
7	AM ₀ (%)	2.9±0.3	3.5±0.8	3.1±0.3
8	M ₀ (րոպե)	0.10±0.02	0.11±0.02	0.07±0.02
9	F_BB=1/<BB>	5.3±0.6	7.6±1.3	6.1±1.1
10	FFT	0.08±0.01	0.07±0.02	0.08±0.03
11	FFT_BB	0.011±0.002	0.006±0.002	0.036±0.014
12	A	5.0±0.6	6.9±2.8	3.8±0.8
13	B	17.7±3.5	19.0±6.4	19.0±3.7
14	C	24.7±3.2	40.3±22.9	30.3±8.2
15	D	30.6±1.6	29.6±1.1	33.5±1.3
16	E	29.4±2.8	38.2±15.4	58.1±22.6

Հետազոտության արդյունքները վկայում են, որ և՛ չափավոր (4000 մ), և՛ սուր հիպոքսիայի (6000մ) պայմաններում ինտեգրատիվ դաշտի ցուցանիշները կրում են որոշակի փոփոխություններ, որոնց թվային արժեքները ներկայացված են աղ. 2,3-ում: Նախկինում կատարած մեր հետազոտությունները՝ բջջային (նեյրոնային ակտիվություն), համակարգային (սրտի գործունեություն, շնչառություն) մակարդակներում վկայում են, որ գրանցված ցուցանիշները կարճ ժամանակ անց վերադառնում են էլակետային մակարդակի [1, 2]:

Այս փորձերում գրանցված ինտեգրատիվ դաշտը, հանդիսանալով այդ ամենի գումարային ցուցանիշը, արտահայտում է օրգանիզմի ընդհանուր ֆիզիոլոգիական վիճակը: Մակայն այս դաշտի վարքագիծը թթվածնային անբավարարության պայմաններում էապես տարբերվում է բջիջների և համակարգերի մակարդակներում գրանցված ցուցանիշներից: Եթե վերջիններս, այն է առանձին նեյրոնների էլեկտրական ակտիվությունը և սրտի աշխատանքի ու շնչառության հաճախությունն ու խորությունը հիպոքսիայի ազդեցությունից հետո մի քանի րոպեի (15 րոպե) ընթացքում վերականգնում են իրենց էլակետային ցուցանիշները, ապա ինտեգրատիվ դաշտի որոշ ցուցանիշների փոփոխությունները հիպոքսիայի ազդեցությունից հետո շարունակվում են դեռ երկար ժամանակ (2 ժ ընթացքում): Հետազոտության արդյունքները ցույց են տվել, որ կենդանիների ֆիզիոլոգիական վիճակին համապատասխան փոխվում է «Բիոսկոպի» ֆոտոընդունիչի ազդանշանը, որը թույլ է տալիս ենթադրելու, որ նշված սարքը օժտված է տարբեր գործոնների ազդեցության պայմաններում օրգանիզմի կենսաբանական ակտիվությունը գրանցելու եզակի ունակությամբ: Ներքին օրգանների և նույնիսկ բջջային առանձին խմբերի վիճակի մասին տեղեկության գրանցումը մարմնի մակերևույթից բավական համոզիչ ապացույց է օրգանիզմի ֆիզիոլոգիական վիճակի մասին: Ստացված արդյունքների հավաստիությունը թույլ է տալիս եզրակացնելու, որ «Բիոսկոպի» կիրառումը բերել է միանգամայն նոր երևույթների և մեխանիզմների բացահայտման, որոնք կարևոր դեր ունեն օրգանիզմի կենսագործունեության պրոցեսներում [9,13]:

Օրգանիզմի ցանկացած հիվանդություն պայմանավորված է բջիջների նյութափոխանակության շեղումներով, որոնք հրահրում են ֆունկցիոնալ վերադասավորումներ և դրանց հետ կապված սեփական ալիքային ճառագայթումների փոփոխված տարբերակներ, որոնք սկզբնական շրջանում արտաքին ախտանիշներ չեն դրսևորում [10]: Թթվածնի անբավարարության ժամանակ օրգանիզմում ակտիվանում են հյուսվածքների և օրգանների ֆունկցիոնալ ակտիվությունը պահպանող հարմարողական այն մեխանիզմները, որոնք կախված են կենսաէներգետիկ մեխանիզմների փոխհատուցողական հնարավորություններից և բջիջների տրանսպորտային համակարգից: Ինչպես ցույց են տվել հետազոտությունները, օրգանիզմի միջհամակարգային ինֆորմացիոն կապերը զգայուն են ոչ միայն հիվանդությունների, այլ նաև սթրեսային ծանրաբեռնվածությունների նկատմամբ, որի ժամանակ

առաջին հերթին խանգարվում են ներբջջային մոլեկուլային կապերը՝ արտաքինից դեռևս աննկատ փոփոխություններով [4]: Վերջիններս փոփոխվում են նաև ախտաբանական զարգացումների ժամանակ [11]: Դա կարող է առաջանալ կենսաբանական համակարգերի ներբջջային և բջիջ-հյուսվածքային մակարդակներում ընթացող ֆիզիկական, ֆիզիկա-քիմիական և քվանտ-ալիքային փոփոխություններով [10]: Հնարավոր է, որ թթվածնաքաղցի պայմաններում ինտեգրատիվ դաշտի շեղումները ևս պայմանավորված են մոլեկուլային մակարդակի փոփոխություններով: Այս հարցը հետագա ուսումնասիրության կարիք ունի, սակայն որպես աշխատանքային վարկած կարելի է ընդունել, որ ինտեգրատիվ դաշտի տատանումները օրգանիզմում ընթացող ախտաբանական զարգացումների ահազանգ են: Այդ իմաստով «Բիոսկոպը» կարելի է օգտագործել որպես այլընտրանքային ոչ կոնտակտային միջոց կենսաբանական համակարգերի ֆունկցիոնալ վիճակների գնահատման համար [9, 13]:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Акопян Н.С.* Электрофизиологические исследования деятельности мозга при гипоксии. Ереван, изд-во “Айастан”, 1987.
2. *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.
3. *Барашенков Б.С., Гальперин Я. Г., Ляблин М.В.* Гипотетические компоненты биофизического поля. ОИЯИ. Р19-93-313. Дубна, 1993.
4. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М. Наука, 1972.
5. *Джан Р.Г.* Нестареющий парадокс психофизических явлений; Инженерный подход. ТИИЭР.70, 3, 63-104, 1982.
6. *Законщиков К.Ф.* Адаптация. Гипоксия. М., Здоровье, 95с., 1996.
7. *Иванов А.О., Сапова Н.И., Александров Н.И., Косенков Н.И.* Использование нормобарической гипоксической тренировки для повышения физической работоспособности здоровых лиц. Физиология человека, 27, 2, с.89-95, 2001.
8. *Нагапетян Х.О., Арутюнян Р.А., Матинян Л.А., Арутюнян К.Р., Нурбемян Л.В.* Изменение температуры у молодых и взрослых крыс в условиях воздействия эмоционально- звукового и фиксационного стрессов. Онтогенез, 32,2, с.154-156, 2001.
9. *Саркисян Р.Ш., Нагапетян Х.О., Саркисян В.Р., Арутюнян Р.А., Вартамян В.Т., Манукян А.М.* Влияние эмоционального стресса на физиологическое состояние бодрствующих крыс в норме и после использования для питья омагниченной воды. Биолог. журн. Армения, 63, 1, с.46-50, 2011.
10. *Судаков К.В.* Голографические свойства системной организации головного мозга. В кн.: Мозг: Теоретические и клинические аспекты. М., Медицина, с. 12-51, 2003.
11. *Эйген М.* Самоорганизация материи и эволюция биологических макромолекул. Мир, с.216, 1973.
12. *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.
13. *Sargsyan R.Sh., Karamyan G.G., Mkrtich N. Avagyan M.N.* Noninvasive Assessment of Physiologic State of Living Systems. The Journal of Alternative and Complementary Medicine. 16, 11, p. 1-8, 2010.
14. *Smaldone M.C., Maranchie J.K.* Clinical implications of hypoxia inducible factor in renal cell carcinoma. Urol Oncol. 27, 3, p. 238-245, 2009.

Unwqylł Է 28.10.2015
Received on 18.01.2016



Biolog. Journal of Armenia, 1 (68), 2016

INFESTATION OF DICE SNAKE *NATRIX TESSELLATA* (LAURENTI, 1768) BY HELMINTHS IN ARMENIA

N.H. SARGSYAN, M.S. ARAKELYAN, F.D. DANIELYAN

*Yerevan State University, Department of Zoology
sargsyannelli@rambler.ru, arakelyanmarine@yahoo.com, fel1938@mail.ru*

One Trematoda species (*Telorchis assula*) and two Cestoda species (*Ophiotaenia europea* and *Spirometra erinacei europea*) of helminthes were found and described for widespread Dice snake *Natrix tessellata* (Laurenti, 1768) in Armenia.

Natrix tessellata – helminthes – *Telorchis assula* – *Ophiotaenia europea* –
Spirometra erinacei europea

Հայտնաբերվել և նկարագրվել են Հայաստանում լայնորեն տարածված ջրային լորտու *Natrix tessellata*-ի (Laurenti, 1768) 3 տեսակի հելմինթներ՝ 1 ծծող և 2 ժապավենաձև որդեր (*Telorchis assula*, *Ophiotaenia europea* և *Spirometra erinacei europea*).

Natrix tessellata – հելմինթներ – *Telorchis assula* – *Ophiotaenia europea* –
Spirometra erinacei europea

Обнаружено и описано 3 вида гельминтов: 1 вид трематоды (*Telorchis assula*) и 2 вида цестоды (*Ophiotaenia europea* и *Spirometra erinacei europea*) у широко распространенного водяного ужа *Natrix tessellata* (Laurenti, 1768) в Армении.

Natrix tessellata – гельминты – *Telorchis assula* – *Ophiotaenia europea* –
Spirometra erinacei europea

Dice snake *N. tessellata* is widespread species in Armenia. It inhabits damp places in various habitats from semi-desert zones to mountain meadows. This snake can be observed also far from water. Usually it is found on riverbanks, channel banks, swamps, mountain streams, lake shores and reservoirs, isolated populations in mountain steppe are also known near small ponds [1]. The color of snake may vary from grayish green to brownish or almost black, with dark spots on the back. The belly is sometimes vividly colored in yellow or orange, with black spots, very similar to dice. Individuals from mountains are usually darker than those found at lower altitudes. Animals are active from mid March to mid October. *N. tessellata* from vicinity of Sevan Lake mostly preys on fish. while snakes living in smaller water bodies - mainly on frogs and toads. Far from water bodies *N. tessellata* preys on lizards (*Ophisops elegans* and *Lacerta media*) and rodents [2, 3].

Very limited information about helminthes of Dice snake in Armenia is available. Only few studies have examined its helminthofauna [4, 5]. In the present paper the helminthofauna of *N. tessellata* living in Armenia was studied.

Materials and methods. A total of 16 snakes were collected from various regions of Armenia during the years 2009-2012. They were transported alive to the laboratory and examined for helminthes. Helminthes found in the gastrointestinal tract, lungs or body cavity were placed in 70% ethanol for later identification. For species identification Cestoda and Trematod were stained with carmine, washed in water, three times dehydrated by ethanol solutions series (70%, 80% and 96%), put in pink balm for brightening and mounted in balm.

Morphology of the parasites was examined under a dissection microscope at 40x and 100x magnification. Identification of helminthes was carried out according to Sharpilo [5].

Results and Discussion. In helminthofauna of *Natrix tessellata* the following three species of helminthes were found: *Telorchis assula*, *Ophiotaenia europea* and *Spirometra erinacei europea*.

Description of helminth species is given below.

1. *Telorchis assula* Dujardin, 1845 (Trematoda: Telorchidae)

Type host: *Natrix tessellata*

Site of infection: small and large intestines

Description (based on 5 specimens): Body elongate, 4-4.9 mm long, 0.3-0.4 mm wide. Maximum wide is near acetabulum (ventral sucker). Tegument is spinose. Oral sucker subterminal, nearly round, 0.11 mm long, ventral sucker 0.09 mm. Oral suckerventral sucker ratio: 1:0.81. Distance between oral sucker and ventral sucker centers 0.14 mm. Esophageal bifurcation in the middle of suckers. Testes are postacetabular. Anterior testis is 0.24 mm long, 0.16 mm wide. Posterior testis is 0.27 mm long, 0.16 mm wide. Distance from posterior testis to posterior end of the body is 0.4 mm. Cirrus is elongated, curved and closely to ovary. Ovary is nearly round, 0.15 mm long, 0.147 mm wide. Vitelline fields are lateral. Uterus has raised branches. Eggs are small, 0.02 mm long, 0.16 mm wide.



Fig.1. *Telorchis assula* Dujardin, 1845 (Trematoda: Telorchidae)

a. General view

b. Testes

c. Ovaries

2. *Spirometra erinacei europea* Rud, 1819 (Cestoda: Diphyllobotriidae), Larval stage

Type host: *Natrix tessellata*, *Macrovipera lebetina*

Site of infection: body cavity

Description (based on 3 specimens): Larval stages of this Cestoda called plerocercoides are parasitizing in reptiles. Its color is milky. Body length is 5-7 mm. Helminthes 3-8 times are shortened and width considerably rises in saline. In scolex situated bothridial fissure, which have 0.2 mm width and 0.4 mm length. Cuticle is well developed. Its thickness 0,007-0,008 mm. Willus in cuticle are absent. Long time can live in water and saline.

3. *Ophiotaenia europea* Odening, 1963 (Cestoda, Ophiotaeniidae)

Type host: *Natrix tessellata*, *Macrovipera lebetina*

Site of infection: small intestine

Description (based on 3 specimens): Body length of mature worm is 330-450

mm, the maximal wide 2.3-3.2 mm. Scolex is spherical and has 0.18-0.2 mm wide. Suckers are oval (0.09x0.09 mm). The longest proglotide is 4.2x1.5 mm.

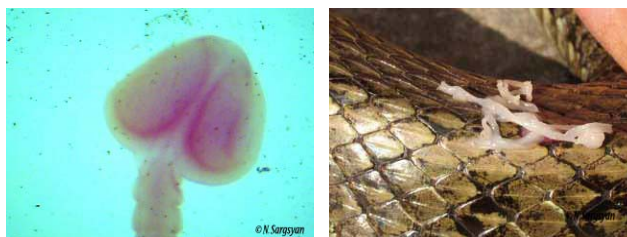


Fig.2. *Telorchis assula* Dujardin, 1845 (Trematoda: Telorchidae)

a. b.

Sexual paths are in the middle of mature segment and divides testes into right and left fields. Total amount of testes is 170. There are oval 0.06x0.07mm. Invaginated bursae is 0.02x0.12 mm. Ovaries are oval 0.4x0.2 mm and have two wings. Vulvae is 0.1 mm. The number of uterine branches is 32-65. Eggs are oval or round 0.05x0.07 mm.

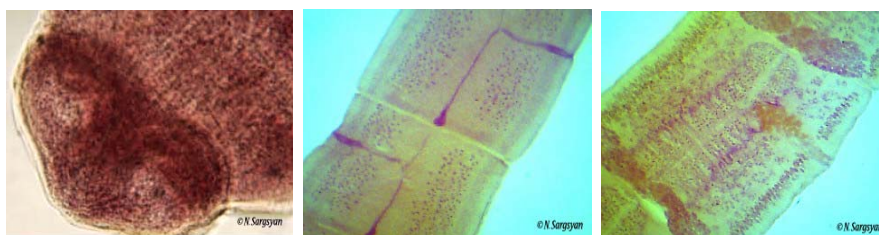


Fig.3 *Ophiotaenia europea* Odening, 1963 (Cestoda, Ophiotaeniidae)

a. Scolex b. Mature segment c. Gravid segment

REFERENCES

1. Arakelyan M.S., Danielyan F.D., Corti C., Sindaco R. and Leviton A.E. The Herpetofauna of Armenia and Nagorno-Karabakh. SSAR, Ithaca, 154 p., 2011.
2. Агасян А.Л. Фауна змей Армении и Нахичеванского региона. Автореф. дисс. канд. биол. наук. Ереван, 186 с., 1996.
3. Даревский И.С. Семейство Ужеобразные змеи (Colubridae). Жизнь животных, 5. М., Просвещение, 280-311, 1985.
4. Шарпило В.П. К познанию гельминтофауны ужей УССР, Вопросы экологии, 3, Киев, Киевский ун-т, 1959:232-239.
5. Шарпило В.П. Паразитические черви пресмыкающихся фауны СССР. Киев: Наукова Думка, 1976:287 с.

This work was been supported by the 15T-1F190 grant.

Received on 12.01.2016



Биолог. журн. Армении, 1 (68), 2016

АРМЕН АМБАРЦУМОВИЧ ТРЧУНЯН

(к 60-летию со дня рождения)

Ученый-биолог, педагог, организатор науки и образования



Приближается юбилей крупного ученого-биолога, известного педагога, видного организатора науки и образования, члена-корреспондента Национальной академии наук Республики Армения, доктора биологических наук, профессора Армена Амбарцумовича Трчуняна.

А.А. Трчунян родился в г. Ереване. В 1973 г. окончил с золотой медалью Ереванскую русскую среднюю школу N 132, а в 1978г. – с отличием биологический факультет Ереванского государственного университета (ЕГУ) по специальности “биофизика”. За годы учебы он проявил выдающиеся способности к творческой деятельности, был

Ленинским стипендиатом, а его дипломная работа была отмечена памятной медалью Минвуза республики как лучшая научная работа студентов. В 1982 г. А. Трчунян защитил кандидатскую диссертацию, в 1990 г. – докторскую, в 2002 г. ему было присвоено ученое звание профессора.

Научная деятельность А. Трчуняна началась на кафедре биофизики биологического факультета ЕГУ, где он был аспирантом, работал после окончания аспирантуры, а в 1993-2011 г. – профессором кафедры. В последующем он развернул свои научные исследования на кафедре микробиологии и биотехнологии растений и микроорганизмов, где с 2011 г. является заведующим кафедрой и руководит базовой лабораторией микробиологии, биоэнергетики и биотехнологии Научно-исследовательского института биологии ЕГУ.

Его научные интересы связаны с изучением ионного транспорта и его роли в физиологии клетки. А. Трчуняном обоснован принцип прямого взаимодействия мембранных систем, предложена модель протонно-калиевого насоса у бактерий, предполагающая прямую передачу энергии от одного белка к другому внутри суперкомплексов, которая сразу привлекла внимание и стала обсуждаться различными научными группами биоэнергетиков. Ему удалось показать механизм такой передачи энергии через дитиол-дисульфидные переходы между белками. А. Трчуняном сформулирована совершенно новая гипотеза протонной АТФазы, играющей ключевую роль в трансформации энергии в клетке, а при брожении, взаимодействуя с другими мембранными белками, выполняющей новые функции у бактерий.

Особое значение приобретают перспективные новаторские исследования лаборатории А. Трчуняна в области образования молекулярного водорода у бактерий – он нашел исключительно важную область исследований и очень скоро стал одним из мировых лидеров в этой области! Изучая механизмы образования водорода и их регуляцию, А. Трчуняном разработана теория регуляции бактериального метаболизма с помощью окислительно-восстановительного потенциала. Совместно с Г. Соверсом (университет Мартина Лютера в Галле-Виттенберге, Германия) предложено взаимодействие протонного и водородного циклов в бактериях как важнейших процессов в клетке. Разработаны новые методы определения водорода и изучены оптимальные условия и механизмы его выделения с участием гидрогеназ; выделены новые штаммы микроорганизмов, генерирующих водород, разрабатываются пути их применения, важные в реализации топливно-энергетической программы. Важен новый феномен - производство водорода бактериями при сбраживании глицерола и других побочных продуктов производств и органических отходов. Получат применение также смешанные источники углерода, фотосинтезирующие несерные бактерии из минеральных источни-

ков Армении и их ассоциации с другими бактериями, а также роль тяжелых металлов. Эти работы уже получили большое международное признание, на которые ссылаются ведущие специалисты биоводородной энергетики. На основании полученных оригинальных результатов А.Трчуняну присуждена премия за выдающиеся заслуги Международной ассоциации водородной энергетики (США, 2014г.), недавно принято решение о присуждении также Международной научной премии Акиры Митсуи (США, 2016г.).

Круг научных интересов А. Трчуняна достаточно широк, ему удается находить острые и привлекательные проблемы и предлагать смелые решения: выявлена совместно с Х. Кобаяши (университет Чибы, Япония) роль второй калиевой транспортной системы в кислых средах; обнаружено усиление чувствительности бактерий к осмотическому давлению, создаваемому натриевыми солями; установлены мембранотропные эффекты электромагнитных миллиметровых волн и увеличение чувствительности бактерий к антибиотикам. Он дал представление о бактериальных мишенях электромагнитных волн, включающих протонную АТФазу. Большой объем исследований проводится А. Трчуняном по международным проектам, финансируемым научными фондами США, Великобритании, Германии, Франции, Японии, др. стран, и в рамках международного сотрудничества. **Нам приходится иногда удивляться его таланту и исключительному трудолюбию, особому умению научного анализа и большой ответственности перед научным сообществом. А. Трчуняна как “ученого-профессионала высокого уровня”, “продуктивного исследователя нашего времени” характеризуют академики В.П. Скулачев и М.А. Островский, многие другие ученые с мировым именем.**

А. Трчунян – автор более 550 научных работ, в большинстве опубликованных в авторитетных журналах в США, Англии, Германии, Нидерландах, России и др. Среди этих работ – критические обзоры в ведущих журналах с высоким импакт-фактором; книга “Bacterial Membranes”, изданная в Индии (2009г.). Он - участник более 75 международных научных форумов в разных странах, на которых выступил с более чем 30 лекциями и устными докладами. По приглашению неоднократно выезжал за границу (США, Англия, Германия, Италия, Канада, Норвегия, Польша, Россия и др.), где в 27 университетах читал лекции и проводил научные семинары, выполнял научные исследования. За цикл работ по изучению мембран бактерий А. Трчунян удостоен премии Президента Республики Армения в области естественных наук (2003г.); за лучшую научную работу – премии Международного союза армян, Министерства диаспоры и НАН Армении (2010г.). Он получил научную премию отличия (США), награжден также орденом Почетного Креста и медалями имени выдающихся биологов (Р. Вирхов, Р. Кох, В. Неговский) Европейской академии естественных наук (Германия), медалью имени Н. Сисакяна.

Особую значимость имеет работа А. Трчуняна как эксперта национальных научных фондов и советов ряда европейских стран. Объективный и требовательный, он признан как выдающийся эксперт и отмечен благодарственной грамотой известного международного научного издательства Elsevier. Он является редактором 2 международных журналов, издаваемых в Швейцарии и Индии, членом редколлегий двух десятков международных и национальных журналов.

А. Трчунян успешно ведет научно-педагогическую работу в ЕГУи Российско-Армянском (Славянском) университете (РАУ). Его лекции отличаются современным подходом и популярны среди студентов и аспирантов. Он – автор учебного пособия “Биологические мембраны” (2001 г.), автор и редактор многих книг, учебников и методических пособий. Проводит активную работу по подготовке кадров в Армении: под его руководством защищены 23 докторские и кандидатские диссертации. Создал прекрасную научную школу; молодые сотрудники лаборатории А. Трчуняна – также лауреаты международных и национальных конкурсов, получили гранты и награды, многие работают в университетах США и европейских стран. Он удостоен званий почетного профессора РАУ и др. университетов. За выдающиеся заслуги в преподавании и подготовке кадров А. Трчунян удостоен лидерского гранта для международных преподавателей ЮНЕСКО и Американского общества микробиологии (2009 г.) и отмечен благодарственной грамотой этого общества (2011 г.). Под его руководством разработаны концепция и программы школьного курса биологии, он редактировал, переработал и дополнил учебники по биологии, является соавтором учебника “Естествознание” для 5-го и 6-го классов (2013-14 гг.), автором книги “В мире живых клеток” для старшей школы.

Многогранна научно-организаторская деятельность А. Трчуняна, которая была развернута на постах начальника Управления науки и подготовки научно-педагогических кадров Министерства образования и науки (2001-02гг.), а затем – председателя Высшей аттестационной комиссии Республики Армения (2002-10гг.). Указом Президента Республики Армения ему присвоена степень государственного советника гражданской службы 2-го класса (2006 г.). Он опубликовал книгу “Современное состояние и тенденции развития высшей научной аттестации” (2004г.). Его научно-организаторская деятельность осуществлялась в советах ЕГУ и Армянского государственного педагогического университета им. Х. Абовяна, продолжается в международных и национальных академиях, ассоциациях и научных обществах. Он член Ученого совета ЕГУ, факультета биологии и др. институтов и научных центров Армении, специализированного совета по присуждению ученых степеней в ЕГУ. Существенной была его многолетняя деятельность как члена Координационного комитета Международного научно-технического центра и Совета по сотрудничеству в области образования стран-участников СНГ, отмеченная грамотой Исполкома СНГ и орденом Ломоносова (Россия). Он – посол Американского общества микробиологии в Армении (с 2012 г.), делегат и член группы по образованию Федерации европейских микробиологических обществ.

За большой вклад в науку и образование А. Трчунян удостоен Благодарственной грамоты Председателя Национального собрания Республики Армения, награжден памятной золотой медалью Министерства образования и науки, золотыми медалями ЕГУ и др. Государственных университетов Армении, медалью Х. Абовяна, а также медалью Маршала Баграмяна и др. медалями и наградами.

Мы взялись охарактеризовать научно-педагогическую и общественно-полезную деятельность А. Трчуняна, но работа оказалась сложной: выделяется многогранность его деятельности и ее исключительная продуктивность, достойные высокой оценки. Сердечно поздравляя Армена Амбарцумовича Трчуняна с юбилеем, желаем ему доброго здоровья, новых успехов в науке и педагогической деятельности.

Академики НАН Армении Э.Г. АФРИКЯН и Л.Л. ОСИПЯН

Редакция “Биологического журнала Армении” поздравляет члена редколлегии, талантливого ученого, интеллигентного и требовательного человека Армена Амбарцумовича Трчуняна с юбилеем, желает ему новых успехов на благо науки и образования.