

ՀՀ ԳԱԱ Հ.ԲՈՒՆԻԱԹՅԱՆԻ անվ. ԿԵՆՍԱՔԻՄԻԱՅԻ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՀՀ ԳԱԱ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ԶԱՐԳԱՑՄԱՆ ՀԻՄՆԱԴՐԱՄ

ՀՀ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՊԵՏԱԿԱՆ ԿՈՄԻՏԵ

ԿԵՆՍԱՔԻՄԻԱՅԻ ԱՆՑՅԱԼԸ, ՆԵՐԿԱՆ և ԱՊԱԳԱՆ

2-3 նոյեմբերի, 2017

ԵՐԵՎԱՆ

Գիտաժողովի թեզիսների և հոդվածների ժողովածու

ԵՐԵՎԱՆ 2017

«Կենսաքիմիայի անցյալը, ներկան և ապագան» երիտասարդ
գիտնականների միջազգային գիտաժողով՝ նվիրված ակադեմիկոս
Հրայրա Բունիաթյանի 110 ամյակին, 2-3 նոյեմբերի, 2017
Գիտաժողովի թեզիսների և հոդվածների ժողովածու
Երևան, ՀՀ ԳԱԱ Ն. Բունիաթյանի անվ. Կենսաքիմիայի ինստիտուտ,
2017թ., 78 էջ:



ՀՐԱՉՅԱ ԽԱՉԱՏՈՒՐԻ ԲՈՒՆԻԱԹՅԱՆ

*Կենսաքիմիկոս, կենսաբանական
գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր,
ՀԽՍՀ ԳԱ ակադեմիկոս,
ՀԽՍՀ գիտության վաստակավոր գործիչ*

Ծնվել է 1907թ. մայիսի 1-ին Նոր Բայազետում (այժմ՝ Գավառ): Ավարտել է տեղի թիվ 1 դպրոցը: 1930թ. ավարտելով ԵՊՀ բժշկական ֆակուլտետը՝ աշխատել է նախ՝ որպես կենսաքիմիայի դասախոս, ապա՝ ղեկավարել Երևանի անասնաբուժական-անասնաբուժական ինստիտուտի, այնուհետև, ավելի քան երկու տասնամյակ, բժշկական ինստիտուտի կենսաքիմիայի ամբիոնը:

1937թ. Հ. Բունիայանը պաշտպանել է դոկտորական ատենախոսություն, իսկ 1939թ. նրան շնորհվել է պրոֆեսորի կոչում: 1939-1941թթ. եղել է Երևանի բժշկական ինստիտուտի գիտական աշխատանքների զծով պրոռեկտոր, 1942-1946թթ.՝ ԵՊՀ ռեկտոր:

1943թ. Հ. Բունիայանն ընտրվել է ՀԽՍՀ ԳԱ ակադեմիկոս և կենսաբանական գիտությունների բաժանմունքի ակադեմիկոս-քարտուղար, այնուհետև ակադեմիայի ակադեմիկոս-քարտուղար և ապա փոխնախագահ: 1943-ից նա ղեկավարել է նաև ՀԽՍՀ ԳԱ՝ Լ. Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի կենսաքիմիայի սեկտորը, իսկ 1961-ից մինչև կյանքի վերջը իր հիմնադրած ՀԽՍՀ ԳԱ կենսաքիմիայի ինստիտուտի տնօրենն էր: Նրա գիտական գործունեության հիմնական ուղղություններն են ուղեղի կենսաքիմիա, օքսիդացման պրոցեսներում և նյութափոխանակության նյարդային կարգավորման մեջ առանձին վիտամինների, ֆոսֆատիդների և կենսածին ամինների կենսաքիմիա: Հ. Բունիայանի հետազոտությունները հնարավորություն տվեցին կարևորել նիկոտինամիդ դինուկլեոտիդի մասնակցությունը ամինաթթուներից ամոնիակի գոյացման մեխանիզմում և նյութափոխանակության կարգավորման մեջ գամմա-կարագաթթվի դերը,

պարզաբանել այդ ամինաթթվի կենսասինթեզի ու կատարողի ուղիները, ուղեղում ամոնիակի գոյացման և չեզոքացման մեխանիզմի հարցերը, կատեխոլամինների ու ֆոսֆոլիպիդների կենսաքիմիական առանձնահատկությունները: Դրանցից շատերը դարձել են առանձին ուղղություններ:

Հ. Բունիայանը կենսաքիմիական գիտության հիմնադիրն է Հայաստանում: Հեղինակ է շուրջ 250 գիտական աշխատությունների: Եղել է կենսաքիմիայի ինստիտուտի կողմից լույս ընծայված «Ուղեղի կենսաքիմիայի հարցերը» գիտական ժողովածուների խմբագիրը: ՀԽՍՀ ԳԱ և ԽՍՀՄ ԳԱ «Նեյրոքիմիա» միջազգային հանդեսի ստեղծումը նույնպես պայմանավորված էր Հ. Բունիայանի մեծ հեղինակությամբ: Նրա ղեկավարությամբ ու խորհրդատվությամբ պաշտպանվել է թեկնածուական 50 և դոկտորական 16 ատենախոսություն: Հ. Բունիայանի նախաձեռնությամբ Երևանում կազմակերպել են միջազգային գիտաժողովներ նվիրված կենսաքիմիայի, հատկապես նեյրոքիմիայի հրատապ խնդիրներին:

Հ. Բունիայանը երկար տարիներ ղեկավարել է հանրապետության ֆիզիոլոգների, կենսաքիմիկոսների և դեղաբանների ընկերությունները, ակտիվորեն մասնակցել միջազգային կենսաքիմիական գիտաժողովների, զեկուցումներով հանդես եկել արտասահմանյան բազմաթիվ երկրների գիտական կենտրոններում, ընտրվել Գերմանիայի բնախոյզների «Լեոպոլդինա» ակադեմիայի անդամ, նյարդաքիմիկոսների միջազգային ընկերության խորհրդի անդամ:

1940թ. Հ. Բունիայանն արժանացել է ՀԽՍՀ գիտության վաստակավոր գործչի կոչման: Վախճանվել է 1981թ. մարտի 19-ին Երևանում: 1982-ից ՀԽՍՀ ԳԱ կենսաքիմիայի ինստիտուտը կոչվում է Հ. Բունիայանի անունով:

ԿԱԶՄԿՈՄԻՏԵ

Հայրապետյան Հ.

կ.գ.թ., դոցենտ, գիտական քարտուղար
ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվ. Կենսաքիմիայի ինստիտուտ

Սահակյան Ի.

կ.գ.թ., երիտասարդ գիտնականների խորհրդի նախագահ
ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվ. Կենսաքիմիայի ինստիտուտ

Սեֆերյան Թ.

կ.գ.թ.
ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվ. Կենսաքիմիայի ինստիտուտ

Թումասյան Ն.

կ.գ.թ.
ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվ. Կենսաքիմիայի ինստիտուտ

Գյուլխանդարյան Ա.

կ.գ.թ.
ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվ. Կենսաքիմիայի ինստիտուտ

Մարգարյան Ա.

կ.գ.թ.
ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվ. Կենսաքիմիայի ինստիտուտ

ԾՐԱԳԻՐ

2 նոյեմբերի, 2017

Իրիս հյուրանոց, Մասիս դահլիճ, Երևան

9:30 – 10:00 Գրանցում

10:00 – 11:00 **Բացման արարողություն՝**

1. ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվ. Կենսաքիմիայի ինստիտուտի տնօրեն Ս. Գ. Չախյանի ողջույնի խոսքը

2. Ակադեմիկոս Հրաչյա Բունիաթյանի դստեր՝ Գայանե Բունիաթյանի խոսքը

3. ՀՀ ԳԱԱ Բնագիտական բաժանմունքի վարիչ Ռ. Մ. Հարությունյանի ուղերձը

4. Ակադեմիկոս Հրաչյա Բունիաթյանին նվիրված վավերագրական ֆիլմի ցուցադրություն՝ հիմնված իր աշակերտների հուշերի վրա

Նիստ 1 Վարդը՝ Հ. Հայրապետյան

11:00 – 11:20 Ազարյան Անի - ԵՊՀ , Աճեցման պայմանների ազդեցությունը ավանի (հայաստան) աղի հանքից մեկուսացված *Haloarcula Japonica* A2 շտամի ընդհանուր կարոտինոիդների արտադրության վրա:

11:20 -11:30 Հարցեր և դիտողություններ

11:30 – 11:50 Իսրայելյան Արևիկ - Արցախի գիտական կենտրոն, Տարբեր կենդանիների կաթից անջատված կթբ-ների հակամանրէային հատկությունները:

11:50 – 12:00 Հարցեր և դիտողություններ

12:00 – 12:20 Հովհաննիսյան Գայանե – ՀՀ ԳԱԱ Կենսաքիմիայի ինստիտուտ, Կալցիների ալտիվության փոփոխությունը հաստատում քաղցկեղի պաթոֆիզիոլոգիայում՝ հիվանդության փուլից կախված:

12:20 – 12:30 Հարցեր և դիտողություններ

12:30 – 13:00 Սուրճի ընդմիջում

Նիստ 2 Վարդդ՝ Թ.Սեֆերյան

13:00 – 13:20 Օլգա Շարկո – Բելորուսիայի ֆիզիկո-օրգանական քիմիայի ինստիտուտ, Ռեազենտները և փոխադրման եղանակները գենային թերապիայում:

13:20 – 13:30 Հարցեր և դիտողություններ

13:30 – 13:50 Պողոսյան Հեղինե – ԵՊՀ, Աճի պայմանների ազդեցությունը քարվաճառի երկրաջերմային աղբյուրից մեկուսացված *Thermus Scotoductus* K1 շտամի ընդհանուր կարոտինոիդների արտադրության եվ կազմի վրա:

13:50 – 14:00 Հարցեր և դիտողություններ

14:00 – 14:20 Զարոյան Աննա - ՀՀ ԳԱԱ Կենսաքիմիայի ինստիտուտ, Տրանսֆերինի և կատիոնային պորֆիրինների հիման վրա մոլեկուլային կոմպլեքսների ստացումը և ուսումնասիրությունը:

14:20 – 14:30 Հարցեր և դիտողություններ

3 նոյեմբերի, 2017

Իրիս հյուրանոց, Մասիս դահլիճ, Երևան

09:30 – 10:00 Գրանցում

Նիստ 1 Վարդի՝ Ն. Թումասյան

10:00 – 10:20 Խաչատրայան Նարինե - ՀՀ ԳԱԱ Կենսաքիմիայի ինստիտուտ, Ամիդների փոխանակության ուղիները ենթաստամոքսային գեղձում:

10:20 – 10:30 Հարցեր և դիտողություններ

10:30 – 10:50 Կարապետյան Լուիզա - ՀՀ ԳԱԱ Կենսաքիմիայի ինստիտուտ, Ադենոզինդեզամինազի իզոմերի ցիտրուլինացումը արթրիտների դեպքում սինովյալ հեղուկներում:

10:50 – 11:00 Հարցեր և դիտողություններ

11:00 – 11:20 Վարդանյան Արևիկ - ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա», Երկրորդային թափոններից մետաղների վերամշակման արդյունավետ տեխնոլոգիա՝ Fe-օքսիդացնող բակտերիաների կիրառմամբ:

11:20 – 11:30 Հարցեր և դիտողություններ

11:30 – 11:50 Բարխուդարյանց Իռեն - ՀՀ ԳԱԱ Կենսաքիմիայի ինստիտուտ, ՊՀ-ի ազդեցությունը ԱԵՖազի ակտիվության վրա սպիտակ առնետների լյարդի միտոքոնդրիումներում կորագոլով մակաձված էպիլեպսանման ցնցումների ժամանակ:

11:50 – 12:00 Հարցեր և դիտողություններ

12:00 – 12:20 Թարոյան Սիրարփի - ՀՀ ԳԱԱ Կենսաքիմիայի
ինստիտուտ, Գլյուտամինաթթվի և ԳԱԿԹ-ի յուրացումը ուղեղի և
ենթաստամոքսային գեղձի միտոքոնդրիումներում նորմալում և
ստրեպտոգոտոցինային շաքարային դիաբետի դեպքում:

12:20 – 12:30 Հարցեր և դիտողություններ

12:30 – 13:00 Սուրճի ընդմիջում

13:00 – 14:00 *Պաստառների ցուցադրություն և քննարկում*

14:00 – 15:00 *Գիտաժողովի փակման արարողություն և
վկայականների հանձնում*

ABSTRACTS

ТЕЗИСЫ

ԹԵԶԻՍՆԵՐ

**EFFECT OF GROWTH CONDITIONS ON TOTAL CAROTENOID
PRODUCTION BY *HALOARCUA JAPONICA* A-2 ISOLATED
FROM AVAN (ARMENIA) SUBTERRANEAN SALT DEPOSIT**

Azaryan A.S., Gabrielyan L.S., Panosyan H.H.,

Trchounian A.H.

YSU, Department of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology

aniazaryan@ysumail.ru

The effect of the conditions of cultivation on the production of total carotenoids of aerobic halophilic *Haloarcula japonica* A2 archaeal strain, isolated from Avan salt mine, has been studied. It has been shown that in case of cultivation of *H. japonica* A2 using casamine acid as carbon source incubating by shaking (150 rpm) and under light conditions the biomass 1.16-fold, while the production of carotenoids 1.4-fold exceeds the corresponding rates for the cultured bacteria in the dark conditions. The maximal productivity of carotenoids of *H. japonica* A2 is 14.6 mg/g.

Halophilic archaea - *Haloarcula japonica* - Biomass - Extraction-
Carotenoids

**THE EFFECT OF PRP ON THE ACTIVITY OF ATPASE IN LIVER
MITOCHONDRIA OF WHITE RATS WITH CORAZOLE-INDUCED
EPILEPTIFORM SEIZURES**

Barkhudaryants I.M., Badalyan R.B., Simonyan A.A.,

Sakeyan R.D., Margaryan A.S.

Institute of Biochemistry after H. Buniatian NAS RA

biren@mail.ru

The aim of this investigation was to study the effect of proline rich polypeptide (PRP) on the age shifts of the catalytic activity of Mg^{2+} -, Ca^{2+} - and HCO_3^- - ATPases in liver mitochondria of white rats with corazole-induced epileptiform seizures.

The obtained data show that the shifts in the catalytic activity of ATPases in the mitochondria of the liver in white rats of three different ages (3, 6 and 9 months) during corazole-induced epileptiform seizures are ambiguous. It was found that the catalytic activity of the enzyme increased in groups of 3 and 9 months white rats by injection only corazole, whereas in group of 6 months it inhibited. It was observed that the prophylactic injection of PRP in all age groups in comparison with healthy rats increase the catalytic activity.

TAURINE AND ALCOHOL: THE INFLUENCE OF TAURINE ON THE CELL STRUCTURES IN THE RAT BRAIN IN CONDITION OF ALCOHOL INTOXICATION

Danielyan M.H., Khachatryan V.P., Savayan A.A., Nazaryan O.H.,
Karapetyan K.V., Ghevondyan T.H.

L. A. Orbeli Institute of Physiology NAS RA
margaritadanielyan@rambler.ru

The carried out histochemical studies testify to the degenerative changes, observed in the cortex of the cerebral hemispheres in the early periods of alcoholization. As a neuronal damage we can see central chromatolysis, lesion of contours of cells and shortening of the processes. Taurine changes the functional parameters of the central nervous system. Also, it restores the energetic balance and endurance of nerve cells so that in behavior of animals disappears aggression or retardation, initially caused by alcohol consumption, diminishes. Rats treated with taurine, was observed

positive changes in the structural properties of neurons and increase in phosphatase activity (increased metabolism) in the regions of the brain that generally determines the cell survival and is significant to primary irritation of neurons in the way of recovery. This indicates a neuroprotective effect of taurine on the cellular structures of the cerebral cortex in the rat. In our experiments, after a short-term alcohol intoxication and the systematic introduction of taurine, we observed an approximation of the diameter of the capillaries of the cerebral cortex to normal. The analysis of data has demonstrated that in comparison with intact animals, after 10 days of alcohol intoxication the capillaries were contracted by 31.4%. Furthermore, the administration of the indices reach to intact group and dilatation by 4.16% took place. Morphometric data indicated the presence of vasodilating effect of taurine on capillary limb of microcirculatory bed of brain, which means taurine possesses an angioprotective property.

Key words: alcohol intoxication, brain, neurons, capillaries, taurine

THE EFFECT OF HYPOTHALAMIC PROLINE-RICH PEPTIDE PRP-1 ON FIBRINOLYSIS

Grigoryan L.S., Stepanyan H.A., Paronyan Z. Kh.

Buniatian Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of the
Republic of Armenia

lusokgrig@gmail.com

PRP-1 belongs to the family of proline-rich peptides released by the neurosecretory nuclei of the hypothalamus, which is multifunctional and participates in different processes of homeostasis: accelerates blood clotting, regulates blood circulation in the brain, has antioxidant, antitumor,

neuroprotector and other properties. It has been confirmed the PRP-1's participation in the multilevel blood coagulation enzyme system. In rates, *in vivo*, it was shown that PRP-1, especially with small doses ($\mu\text{g}/100\text{g}$), the blood clotting accelerates by 35,5%, the recalcification time by 44%, protrombin time by 31,1%, and the thrombin time decreases by 25%, i.e, has high coagulation activity.

As the blood coagulation and her opposite process of hemostasis, the fibrinolysis is constantly accompanying each other and the connection between them occurs in the same way as the activation of the enzyme cascade, also studied the participation of PRP-1 in fibrinolysis.

Experiments were performed by the traditional euglobulin fibrinolysis method, the obtained data showed that, depending on the dose, under the influence of PRP-1, slow down fibrin degradation process. Thus, in the case of $\mu\text{g} / 100\text{g}$ dose, fibrinolysis slow down by 36%.

The study of the mechanism of action of proline-rich peptide PRP-1 on fibrinolysis continues and will be presented in the near future as an article.

IMMUNOMODULLATORY ACTIVITY OF THE ETHANOLIC FRACTION OF *ZIZIPHORA SERPYLLACEA L.* LEAVES

Gyozalyan M.¹, Harutyunyan K.², Hayrapetyan M.²,
Musayelyan R.², Khondkaryan L.¹

¹ Institute of Molecular Biology, NAS RA, Yerevan, Armenia
² Artsakh Scientific Centre, RNK

gyozalyanmeri@gmail.com

Inflammation is a response of an organism to tissue injury or infectious agents. However, when persistent it can lead to development of a

range of diseases . Modern commercially available immunosuppressive drugs are often ineffective and possess severe side-effects, thus prompting the search of new candidates.

The interest of researchers in medicinal plants as natural source of many active components has noticeably increased in the past 20 years and the particular attention has been given to substances which are used as folklore medicines. *Ziziphora serpyllacea* is widely used in Artsakh for treatment of a number of inflammatory conditions. Therefore, in the present study we aimed to evaluate the influence of ethanolic extracts of *Z. serpyllacea* leaves collected in Artsakh on LPS-induced immune responses by human blood cells.

The cytotoxic activity of the plant extract against whole blood (WB) cells was assessed by flow cytometry, while genotoxicity was evaluated by cytokinesis-block micronucleus assay. Pro- (TNF α) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines secretion upon co-treatment of whole blood with non-toxic concentration of plant extract, corresponding to IC₂₀ value and LPS were measured by ELISA. Data were analysed using Wilcoxon matched pair test by Graphpad Prism.

Z. serpyllacea had no effect on cells viability, except for the highest concentration tested (2mg/ml), which only slightly reduced viability of monocytes and neutrophils, while did not affect lymphocytic population. We did not find any significant change in the frequency of micronuclei upon treatment with non- toxic concentration of *Z. serpyllacea* extract (500 μ g/ml) in comparison with untreated cells. Treatment of WB with LPS and the plant extract (500 μ g/ml) resulted in decreased secretion of TNF α as compared to LPS treated cells, while no change in the levels of IL-10 were found.

In overall, the present study suggested, that ethanolic extract of *Z. serpyllacea* significantly reduced inflammatory response in the presence of LPS, which appears ideal to overcome immune activation observed in a number of life-threatening diseases. This warrants further investigation involving components of *Z. serpyllacea* for possible development of new class of anti-inflammatory drugs.

CALCINEURIN ACTIVITY CHANGES IN PATHOPHYSIOLOGY OF COLON CANCER DEPENDING ON STAGE OF DISEASE

Hovhannisyan G., Sarukhanyan F., Hunanyan O., Zakaryan H.,
Barkhudaryan N.

H. Buniatian Institute of Biochemistry NAS RA, Yerevan, Armenia
gayane90.30@gmail.com

Recently, we have found that changes in calcineurin, a serine/threonine phosphatase activity in the pathophysiology of breast, ovary, uterine and cervical cancer depend on the stage of disease and are organ-specific. In present study we have investigated the changes of calcineurin activity in pathophysiology of colon cancer depending on age of patients and stage of disease. Enzyme activity has been determined by the spectrofluorimetric assay in plasma and tissue samples of the untreated oncologic patients. The plasma of healthy donors and histologically checked healthy parts of remote tissue were used as a control. Results obtained demonstrated that calcineurin activity increases significantly in the plasma and tumor tissue of patients with II (13 fold and 2 fold, respectively) and III (27 fold and 4 fold respectively) stages of disease compared with the control. However, we have

not found a statistically significant increase in calcineurin activity in plasma and tissue samples, depending on the age of the patients. These findings highlight that the changes in calcineurin activity in pathophysiology of colon cancer depend on stage of disease.

Acknowledgment: We thank to National Center of Oncology after V.A. Fanarjyan (Ministry of Healthcare, RA), especially the Laboratory of Clinical Pathomorphology, for provided oncological samples.

ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF LAB ISOLATED FROM MILK OF DIFFERENT ANIMALS

Israyelyan A. L., Arstamyany L.A., Aleqsanyan L.A.

“Artsakh Scientific Center” SNPO, Stepanakert, Republic of Artsakh

arevik_israelyan@mail.ru

Key words: antimicrobial preparation, metabiotic, culture liquid.

In order to investigate the microflora of dairy products, were isolated 270 samples of LAB from milk and dairy products from different domestic animals (goats, sheep, buffaloes, cows) from different regions of the Republic of Artsakh. Comparison of results of genotyping of selected strain by sequencing of 16S RNA gene shown, that LAB strains, isolates from milk and fermented dairy products of AR were mainly related to species of **Enterococcus** genus. The isolated strains have different probiotic properties. Were purified by gel filtration (Sephadex G25), the culture liquids (CL) of some LAB strains, which obtained from the separate cultivation and were preparations were prepared (metabiotics). It was shown that the metabiotics have ability to inhibit the growth of antibiotic-resistant pathogen bacteria.

It was shown that metabiotic from CL *Ent. faecium* M14 inhibited grows of pathogen bacteria *Staph. aureus sp.*- 0%, *Ps. aeruginosa*-50%, *Pr. mirabilis*-50% ,*Klebsiella sp.*-0%, *Pr. vulgaris*-0%, *E.coli sp.*-50%, but metabiotic from CL *Ent. faecium* KV15 inhibited grows of pathogen bacteria accordingly *Staph. aureus sp.*- 0%, *Ps. aeruginosa*-50%, *Pr. mirabilis*-50%, *Klebsiella sp.*-100%, *Pr. vulgaris*-66%, *E.coli sp.*-33%.

From the obtained results, it can be concluded that AMP from different strains of LAB of genus of Enterococcus have different antibacterial effectivity to multidrug resistance pathogen bacteria, in addition AMP from the strains of LAB from the milk of different animals (goats, sheep, buffalo) inhibit antibiotic-resistant pathogens better. It is assumed that further studies of AMP will allow use in medicine and in food safety.

Acknowledgments: This work realized with financial support of the RA MES State Committee of Science project “16AA-03, 2016”.

THE CITRULLINATION OF ADENOSINE DEAMINASE ISOFORMS IN SYNOVIAL FLUIDS AT ARTHRITIS

Karapetyan L.G., Sharoyan S.G., Antonyan A.A., Mardanyan S.S.

H. Buniatian Institute of Biochemistry of NAS RA, 5/1 Sevak Str., Yerevan
0014, Armenia,

biochem@ipia.sci.am

The study of protein citrullination attracts a great interest because of its involvement in the several physiological and pathological processes. The citrullinated proteins are linked to the progression of multiple sclerosis, RA, Alzheimer’s disease, etc. The conversion of arginine into citrulline leads to

the change in the protein charge: the positive charge is lost, the isoelectric point is altered and the interaction with other proteins is affected.

The attention is paid to the identification of biomarkers for differentiating the arthritis type. The most important discovery in rheumatology in recent years was the characterization of citrulline containing auto-antigens .The identification of citrullinated proteins as auto-antigens and the development of new assay based on the detection of ACPAs become a major breakthrough in the laboratory diagnostics of arthritis The family of anti-citrullinated protein antibodies (ACPAs) is expected to widen, because there is an increasing need for developing new diagnostic strategies. Very significant is the demonstration of adenosine deaminase (ADA) as a novel antigen by some researchers.

In our previous works we found the statistically significant difference in the ADA activity levels in SFs of patients with RA and osteoarthritis. Hence, the ADA activity is considered as a biomarker suitable for differentiation of these diseases in Armenian population.

In the present work, we separated and purified small and large isoforms of ADA (SADA and LADA, respectively) from SFs of different arthritis. Their ratio in SFs of rheumatoid, reactive and juvenile idiopathic arthritis, ankylosing spondylitis and gout was determined. The SF samples with the similar initial activities of the enzyme were taken. The data shown the drastically larger SADA/LADA ratio in the case of RA compared with the other four joint diseases. We researched the citrullination of SADA and LADA forms of ADA in SFs of different arthritis.SADA separated and purified from SF of RA appeared in the citrullination state unlike SADA purified from the other arthritis, were not citrullinated. LADA isoforms isolated and purified from all the studied arthritis were not citrullinated.

**EFFECT OF GROWTH CONDITIONS ON PRODUCTION AND
COMPOSITION OF TOTAL CAROTENOIDS OF *THERMUS
SCOTODUCTUS* K1 ISOLATED FROM GEOTHERMAL SPRING OF
KARVACHAR**

Poghosyan H.L., Panosyan H.H., Trchounian A.H.

YSU, Department of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology

heghine-95@mail.ru

The effect of cultivation conditions (temperature, pH, aeration, and lighting) on biomass and general carotenoids productivity of *Thermus scotoductus* K1 isolated from the geothermal spring of Karvachar in NKR. It has been shown that the maximum specific productivity of carotenoids (1.3 mg / g) of *T. scotoductus* K1 is maintained at a pH of 8, 65 ° C, regardless of lighting conditions. It has been shown that although the specific productivity of carotenoids is not related to the lighting conditions, but the lighting affects the composition of the carotenoids.

Thermophilic bacteria - *Thermus scotoductus* - Biomass - Extraction-
Carotenoids

**EFFECT OF THE HYPOTHALAMIC PROLINE-RICH
POLYPEPTIDES (PRP-1) ON THE VIABILITY OF MOUSE
EHRlich ASCITES CARCINOMA (EAC) CULTURED CELLS**

Sahakyan I.K. *, Tumasyan N.V. *, Kocharyan N.V. *, Galoian K.A. ** and
Abrahamyan S.S. *

* Buniatian Institute of Biochemistry, NAS, Yerevan, Armenia

** University of Miami, Miller School of Medicine, Department of
Orthopedics, Miami, FL, U.S.A

Using histological, histochemical, immunohistochemical methods, and fluorescence microscopy assay, the morpho-functional investigations have been performed on the mice inoculated with the Ascite Ehrlich carcinoma aimed at studying the action of one of the hypothalamic proline-rich polypeptides (PRP-1, Galarmin) on the tumor cells, as well as at detecting PRP-1 in the cancer cell structures. Investigations have been performed by us in vitro on the cultures of the above mentioned tumor cells together with the coworkers of the Department of Orthopaedics of Miller School of Medicine, University of Miami (research director prof. Karina Galoian).

According to the results obtained, administration of the various doses of PRP-1 (0.1 1.0, and 10 mkg/ml) led to the inhibition of the cancer cells growth by 20-35% in comparison to the control samples. Using the histological vital stain Trypan blue that is known to selectively color dead tissues and cells blue, decrease of the number of the living cancer cells in result of PRP-1 action was revealed by light microscopic investigation. The studies were also carried out to find the mechanisms of PRP-1 action. Thus, the WST-1 tetrazolium salt was used to show the cytostatic (antiproliferative) effect of PRP-1. In addition, the fluorescent method using Annexin V was applied to show the cytotoxic (apoptotic) effect of PRP-1. The results obtained demonstrated mainly the cytotoxic effect of PRP-1.

Additionally, using antiserum against the PRP-1, the PRP-1-immunopositive nuclei were immunohistochemically revealed in the tumor cells of the control samples, which allowed us to suggest the possible synthesis of the endogenous PRP-1 in the cancer cells.

**THE INFLUENCE OF PRP ON THE ACTIVITY OF ATPASE IN
THE BRAIN OF WHITE RATS
WITH CORAZOL-INDUCED EPILEPTIFORM SEIZURES**

Sakeyan H.D., Badalyan R.B., Barkhudaryants I.M.,

Simonyan A.A., Margaryan A.S.

Institute of Biochemistry after H. Buniatian NAS RA

simisaqeyan@mail.ru

It was investigated the influence of proline rich polypeptide (PRP) on the changes in the catalytic activity of Mg^{2+} -, Ca^{2+} - and HCO_3^- -ATPases in mitochondria, mitochondrial membranes and soluble fraction of mitochondria in white rats brain under corazole-induced epileptiform seizures.

The obtained data show that ATPase activity is increased in mitochondria, mitochondrial membranes and soluble fraction of mitochondria in epileptic rats' brain. It was observed inhibition of the activity of the investigated enzymes in mitochondria and mitochondrial membranes, in comparison with the group of epileptic rats, during the prophylactic injection of PRP. It was observed activation in the soluble fraction of the mitochondria.

Thus, the obtained data show that during of corazol-induced epileptiform seizures the PRP has unequal influence.

**UTILIZATION OF GLUTAMATE AND GABA IN THE BRAIN AND
PANCREAS MITOCHONDRIA IN NORM AND STREPTOZOTOCIN
INDUST-EXPEREMENTAL DIABETRS.**

Taroyan S.Q., Khachatryan H.S., Khachatryan N. KH., Vardanyan A. G.,
Qamalyan R. G.

Institute of Biochemistry after H. Buniatian NAS RA

sirarpy.taroyan@mail.ru

It was shown the inhibition of general way of glutamate and GABA utilization in brain and pancreas mitochondria in streptozotocin-induced diabetes. ATP levels to some extent this process with respect to glutamate,

but not GABA. Streptozotocin inhibits glutamate and particularly GABA utilization in brain and pancreas mitochondria. This can influence on the endocrine functions of pancreas.

Brain - pancreas – diabetes- streptozotocin - glutamate - GABA

**MECHANISMS OF INTERACTION BETWEEN THE
CEREBELLAR CORTEX AND THE MEDIAL RETICULAR
FORMATION**

Terzyan D.O., Margaryan A.V., Grigoryan M.L.,

Manvelyan L.R.

L.A. Orbeli Institute of Physiology, Yerevan, RA

dinaart@mail.ru

Abstract. In experiments on a perfused brain in frog, intracellular potentials of neurons of the medial reticular formation (MRF) were registered in response to irritation of the ipsilateral vestibular nerve and the auricular lobe of cerebellar cortex. Stimulation of the vestibular nerve caused mono- and polysynaptic excitatory postsynaptic potentials in MRF neurons. We received mono- and polysynaptic inhibitory postsynaptic potentials in the MRF neurons in answer to Purkinje cells stimulation.

medial reticular formation - auricular lobe of cerebellum

ARTICLES
СТАТЬИ
ՀՈՂՎԱԾՆԵՐ

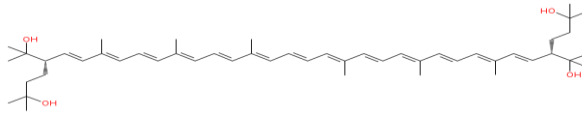
ԱՃԵՑՄԱՆ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՎԱՆԻ
(ՀԱՅԱՍՏԱՆ) ԱՂԻ ՀԱՆՔԻՑ ՄԵԿՈՒՍԱՑՎԱԾ *HALOARCULA*
JAPONICA A2 ՇՏԱՄԻ ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ԿԱՐՈՏԻՆՈՒԴՆԵՐԻ
ԱՐՏԱԴՐՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ագարյան Ա.Ս., Գաբրիելյան Լ.Ս., Փանոսյան Հ.Հ.,
Թռչունյան Ա.Հ.

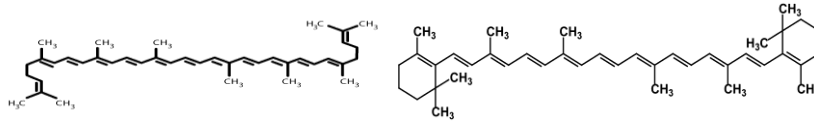
ԵՊՀ, Կենսաքիմիայի, մանրէաբանության և
կենսատեխնոլոգիայի ամբիոն
aniazaryan@ysumail.ru

Էքստրեմոֆիլ մանրէների առանձին խումբ են կազմում հալոֆիլ արքեաները, որոնց հատուկ կենսացենոզները ձևավորվում են բնական աղի հանքերում, աղային ջրամբարներում և աղուտալկալի հողերում [7, 10, 14]: Վերջին տարիներին *Haloarcula*, *Halococcus*, *Halobacterium*, *Halorahdbuns*, *Haloferax*, *Natrialba*, *Natronococcus*, *Natromonas* և *Natrococcus* ցեղերին պատկանող մանրէները լայն կիրառություն են գտել կենսատեխնոլոգիական մի շարք արտադրություններում՝ աղակայուն ֆերմենտների՝ պրոտեազների, ամիլազների, գլիկոզիլ հիդրոլազների, էսթերազների և կեսաբանական ակտիվ նյութերի՝ էկզոպոլիսախարիդների, β-հիդրօքսիալկանոատի ստացման մեջ [2, 7, 11; 13]:

Հալոարքեաները կարոտինոիդների՝ բակտերիառուբերինի և դրա ածանցյալների, լիկոպինի, β-կարոտինի, ֆիտոենի բավականին արդյունավետ արտադրիչներ են [6, 9, 12, 16]:



բալտերիառուբերին



Լիկոպեն

β-կարոտեն

Բջջատոքսիկ, հակաօքսիդանտային և հակաքաղցկեղային ակտիվության օժտված կարոտինոիդային նյութերի ակտիվ արտադրիչ այդ մանրէները հեռանկարային կարող են լինել դեղագործական և բժշկական կենսատեխնոլոգիաներում կիրառման տեսանկյունից [2, 8]:

Ցույց է տրված, որ սինթեզվող կարոտինոիդների քանակի և կազմի վրա ազդեցություն են թողնում աճեցման պայմանները՝ լույսի ինտենսիվությունը, օդավորումը, սննդամիջավայրում NaCl-ի կոնցենտրացիան, ինչպես նաև որոշ ֆիզիկաքիմիական գործոններ, հատկապես pH-ը [1, 12]:

Ներկայացվող աշխատանքի նպատակն է եղել որոշել Ավանի աղի հանքից մեկուսացված հալոֆիլ արքեա *Haloarcula japonica* A2-ի ընդհանուր կարոտինոիդների արտադրության վրա աճեցման պայմանների ազդեցությունը:

Նյութ և մեթոդ: Ուսումնասիրության նյութ է հանդիսացել Ավանի աղի հանքի քարաղի նմուշներից մեկուսացված և ֆենոտիպական հատկանիշների և 16S rDNA-ի գենի նուկլեոտիդային հաջորդականությունների վերլուծության հիման վրա նույնականացված աերոբ հալոֆիլ *H. japonica* A2 արքեային

շտամբ [4]: Մանրէային կուլտուրայի աճեցման և պահպանման համար կիրառվել է հետևյալ բաղադրությամբ սննդամիջավայր (գ/լ)՝ խմորասնկային մզվածք, 5; կազամինաթթու կամ պեպտոն, 5; Na-ի գլյուտամատ, 1; Na-ի ցիտրատ, 3; NaCl, 200; KCl, 3, MgSO₄ · 7H₂O, 20; FeCl₂ · 4H₂O, 0.036; MnCl₂ · 4H₂O, 0.00036; ազար-ազար 20 (պինդ սննդամիջավայր ստանալու համար), pH 7.0-7.2 [3]: Առավելագույն աճ ապահովող ածխածնի աղբյուրի ընտրության համար *H. japonica* A2 շտամբ աճեցվել է հեղուկ սննդամիջավայրում որպես ածխածնի և ազոտի աղբյուր պեպտոնի կամ կազմինաթթվի կիրառմամբ: Մանրէները աճեցվել է 37 °C ջերմաստիճանային պայմաններում 10 օր ինկուբացմամբ (մինչև աճի ստացիոնար փուլ), օդավորման (150 պտույտ/ր թափահարման) և առանց օդավորման, լույսի (պարբերական բնական լուսավորման) և մթության պայմաններում: Ինկուբացման 10 օրերի ընթացքում պարբերաբար իրականացվել է բջջային կախույթի օպտիկական խտության որոշում ($\lambda=600$ նմ, սպեկտրալուսաչափիչ Termocicle Genesis10S): Ինկուբացման ավարտին բջջային կախույթը կենտրոնախուսվել է (10000 պտույտ/ր, 5 ր, 4 °C) և որոշվել է ստացված կենսազանգվածի չոր քաշը: Կարոտինոիդային գունանյութերի լուծամզման համար կենսազանգվածը 24 ժամ անընդհատ մագնիսկան խառնիչով թափահարվել է մթության պայմաններում սենյակային ջերմաստիճանում՝ օգտագործելով տարբեր լուծիչներ՝ մեթանոլ, ացետոն, էթանոլ և հեքսան: Լուծամզվածքը բջջային ջարդոնից առանձնացվել է կենտրոնախուսմամբ (12000 պտույտ/ր, 15 ր, 4 °C):

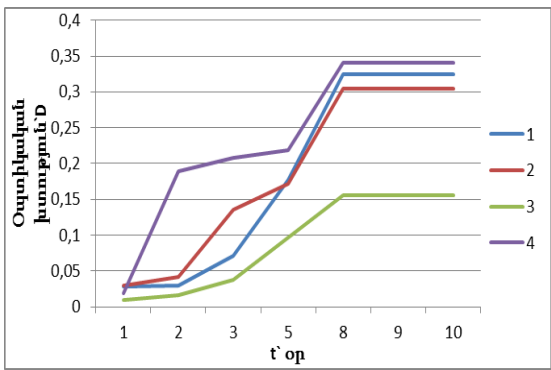
Ստացված լուծամզվածքի կլանման սպեկտրը վերլուծվել է 400-700 նմ երկարությամբ ալիքների տիրություն սպեկրտրալուսաչափամբ (Spectro UV-Vis Auto սպեկտրալուսաչափիչ (Labomed, USA): Կարոտինոիդային գունանյութերի չոր քաշի հաշվարկման համար լուծամզվածքները տեղադրվել է վակուումային չորանոցում (BOV-50 V, Biobase Meihua Trading, China) մինչև լուծիչի ամբողջական ցնդելը: Կարոտինոիդների արտադրողական ելքը հաշվարկվել է ստացված ընդհանուր կարոտինոիդային գունանյութերի և կենսազանգվածի չոր քաշերի հարաբերությամբ: Փորձնական արդյունքների տվյալները երեք անկախ փորձերի միջինն են:

Արդյունքներ և քննարկում: Մենդամիջավայրում ածխածնի տարբեր աղբյուրների կիրառմամբ և աճի օպտիմալ պայմաններում (37 °C, pH 7.2) օդավորմամբ և առանց օդավորմամբ *H. japonica* A2-ի բջիջների օպտիկական խտությունը ժամանակից կախված ներկայացված են նկար 1-ում: Ինչպես երևում է նկարից *H. japonica* A2-ի առավելագույն օպտիկական խտություն (բջջային կենսազանգված) դրսևորվում է որպես ածխածնի աղբյուր կազամինաթթվի կիրառմամբ օդավորման պայմաններում աճեցնելիս:

Մանրէի աճը աղի բարձր խտության պայմաններում ընթանում է դանդաղ, բջիջների աճի էքսպոնենցիալ վաղ փուլը սկսում է կուլտիվացման 2-րդ օրը, իսկ ստացիոնար փուլին մանրէն հասնում է կուլտիվացման 8-րդ օրը: Առանց օդավորման պայմաններում աերոբ նյութափոխանակություն ունեցող *H. japonica*

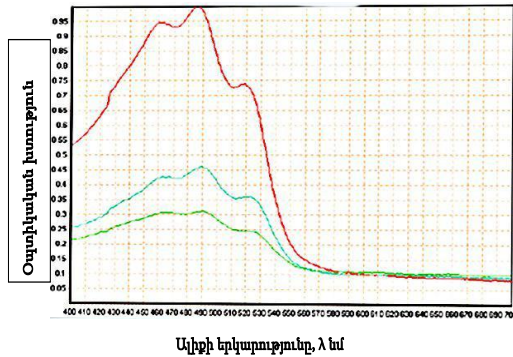
A2-ի աճի դանդաղ դրսևորումը պայմանավորված է հավանաբար աղի բարձր խտության պայմաններում թթվածի դժվար լուծելիությամբ:

Կարոտինոիդային գունանյութերի լուծամզում չի հաջողվել իրականացնել հեքսանային լուծիչի կիրառմամբ, իսկ մյուս լուծիչներով լուծամզման արդյունավետության որոշման և ստացված լուծամզվածքների սպեկտրալուսաչափական մեթոդով կլանման սպեկտրերի արդյունքերը ամփոփված են նկար 2-ում:



Նկար 1. *H. japonica* A2-ի բջիջների օպտիկական խտությունը կախված միջավայրում աճի ամսվանից (1. պեպտոն, օդավորում, 2. պեպտոն, առանց օդավորման, 3. կազամինաթթու, առանց օդավորման, 4. կազամինաթթու,

Ինչպես երևում է նկար 2-ից կենսազանգվածից կարոտինոիդային գունանյութերի առավելագույն լուծամզում իրականացվել է մեթանոլային լուծիչով՝ կլանման սպեկտրում ունենալով 462, 487 և 519 նմ կլանման գագաթներ: Փորձերի հաջորդ փուլում գունանյութերի լուծամզման համար կիրառվել է առավել արդյունավետ լուծամզում ապահովող միայն մեթանոլային լուծիչը: Աճի օպտիմալ ջերմաստիճանային և pH-ի պայմաններում, օդավորմամբ լուսավորության և մթության մեջ ինկուբացնելիս բջջային կենսազանգվածի և կարոտինոիդների ելքի որոշման տվյալները ամփոփված են աղյուսակ 1-ում:



Նկար 2. *H. japonica* A2-ի բջիջների մեթանոլային (կարմիր), ացետոնային (կապույտ) և էթանոլային (կանա) լուծամզվածքների կլանման սպեկտրերը:

Աղյուսակ 1. *H. japonica* A2 շտամի բջջային կենսազանգվածի և կարոտինոիդների էլքերը լուսավորության և մթության պայմաններում

	Բնական պարբերական լուսավորություն	Մթություն
Կարոտինոիդներ (մգ/լ)	10.2	7.3
Կենսազանգված (գ/լ)	0.7	0.6
Արտադրողական էլքը (մգ/գ)	14.57	12.67

Ինչպես երևում է աղյուսակից մանրէները սենյակային լուսավորության պայմաններում աճեցնելիս կենսազանգվածը 1.16, իսկ կարոտինոիդների էլքը 1.4 անգամ գերազանցում են մթության մեջ կուլտիվացված մանրէների համապատասխան ցուցանիշները: Բջջային կենսազանգվածը իր առավելագույն արժեքին հասնում է աճի ստացիոնար ուշ փուլում (աճեցման 10-րդ օրը)՝ օրական կենսազանգվածի հաշվարկով կազմելով 0.07 գ/լ: Կարոտինոիդների արտադրողական էլքը աճի ստացիոնար փուլում հաշվարկված ըստ բջջային չոր քաշի կազմում է 14.57 մգ/գ (օրական արտադրողականությունը՝ 1.457 մգ/գ): Հայտի է, որ կարոտինոիդային գունանյութերի ակտիվ արտադրիչ *Halorubrum* sp. TBZ126-ի առավելագույն արտադրողական էլքը՝ 25 մգ/գ է (2.5 մգ/գ

օրական հաշվարկով) [5, 12], որը 1.7 անգամ գերազանցում է *H. japonica* A2-ի կարոտինոիդների արտադրողական ելքին: Իհարկե *H. japonica* A2 դեռևս զիջում է արտադրական շտամին, սակայն աճի պայմանների հետագա բարելավումը կարող է արտադրողականությունը մոտեցնել արտադրական ցուցանիշին:

Միաբջիջ ջրիմուռների համեմատությամբ, որոնցում այս ցուցանիշը 10 մգ/գ է, *H. japonica* A2 ունի առավելություն և իր արտադրողական ելքով 1.46 անգամ գերազանցում է ջրիմուռների արտադրողականությանը: Բացառություն է կազմում *Dunaliella salina* հալոֆիլ ջրիմուռը, որը ներկայումս հայտնի ամենաարդյունավետ կարոտինոիդային արտադրիչն է, իսկ արտադրողականությամբ 5-10 անգամ գերազանցում է հալոֆիլ արքեաների արտադրողականությանը [15]: Միկրոջրիմուռները հալոարքեաների նկատմամբ ունեն առավելություն բնական լույսը որպես միակ էներգիայի աղբյուր և ածխաթթու գազը որպես ածխածնի աղբյուր օգտագործման տեսանկյունից: Սակայն հալոարքեաների, որոնց աճի համար լույսը պարտադիր պայման չէ, առավելությունը կայանում է նրանում, որ կենսազանգվածի աճ ապահովում են ոչ միայն մակերեսով, այլ ծավալով, այսինքն՝ մեծ է արտադրողականության ծավալ/մակերես հարաբերակցությունը և, հետևաբար, մեծ է ծավալային կենսազանգվածի արտադրողականությունը:

Այսպիսով, Ավանի աղի հանքից մեկուսացված աերոբ հալոֆիլ *H. japonica* A2 արքեային շտամը առավելագույն աճ դրսևորում է որպես ածխածնի աղբյուր կազամինաթթու պարունակող սննդամիջավայրում օդավորման (150 պտույտ/ր)

պայմաններում ինկուբացնելիս: *H. japonica* A2 սենյակային լուսավորության պայմաններում աճեցնելիս կենսազանգվածը 1.16, իսկ կարոտինոիդների էլքը 1.4 անգամ գերազանցում են մթության մեջ կուլտիվացված մանրէների համապատասխան ցուցանիշները: *H. japonica* A2-ի կարոտինոիդների առավելագույն արտադրողական էլքը կազմում է 14.6 մգ/գ:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Abbes M., Baati H., Guerhazi S., Messina C., Santulli A., Gharsallah N., Ammar E. Biological properties of carotenoids extracted from *Halobacterium halobium* isolated from a Tunisian solar saltern. BMC Complementary and Alternative Medicine, 13, 255, p. 1-8, 2013.
2. Das Sarma P., Coker J.A., Huse V., DasSarma Sh. Halophiles, industrial applications. In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology. Ed., Flickinger M.C., John Wiley & Sons, Inc., p. 1-9, 2010.
3. Das Sarma S., Fleoschmann E.M. Archaea, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor: Cold Springer Harbor Laboratory Press, 1995.
4. Hakobyan A., Panosyan H., Trchounian A., Birkeland N.K. Microbial diversity analysis of an Armenian subterranean salt deposit using molecular and culture-based methods. Book of Abstracts 10th International Congress on Extremophiles, Extremophiles 2014, Saint Petersburg, Russia, p. 144, 2014.
5. Hamidi M. Abdin M.Z., Nazemyieh H., Hejazi M.A., Hejazi M.S. Optimization of total carotenoid production by *Halorubrum* sp. TBZ126 using response surface methodology. J. Microb. Biochem. Technol., 6 (5), p. 286-294, 2014.
6. Kittikun A., Visessanguan W., Benjakul S., Tanasupavat S., Bovornreungroj P. Carotenoid Production by halophilic Archaea and its applications, p. 15-34. 2009.
7. Maheshwari D.K., Saraf M. Halophiles, Biodiversity and Sustainable Exploitation. Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London Springer International Publishing Switzerland, 2015.
8. Mandelli F., Miranda V.S., Rodrigues E., Mercadante A.Z. Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced

- by extremophile microorganisms. *World. J Microbiol Biotechnol.* 28, p. 1781-1790, 2012.
9. Naziri D., Hamidi M., Hassanzadeh S., Tarhriz V., Zanjani M.B., Nazemyieh H., Hejazi M.A., Hejazi M.S. Analysis of carotenoid production by *Halorubrum* sp. TBZ126; an extremely halophilic archeon from Urmia Lake. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 4 (1), p. 61-67, 2014.
 10. Oren A. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 28, p. 56–63, 2002.
 11. Oren A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ. Technol.*, 31, p. 825-834, 2010.
 12. Rodrigo-Bañón M., Garbayo I., Vílchez C., José Bonete M., Martínez-Espinosa M. Carotenoids from haloarchaea and their potential in biotechnology. *Marine drugs*, 13, p. 5508-5532, 2015.
 13. Shivanand P., Mugeraya G. Halophilic bacteria and their compatible solutes – osmoregulation and potential applications. *Current science*, 100 (10), p. 1-10, 2012.
 14. Ventosa A., Mellado E., Sanchez-PorroMarquez M.C. Halophilic and halotolerant microorganisms from soils In: *Microbiology of extreme soils*, Eds., Dion P., Nautiyal Ch. Sh. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 87-116, 2008.
 15. Wichuk K., Brynjolfsson S., Fu W. Biotechnological production of value-added carotenoids from microalgae: Emerging technology and prospects. *Bioengineered*, 5, p. 204–208, 2014.
 16. Yatsunami R, Ando A., Ynag Y., Takaichi Sh., Kohno M., Matsumura Y., Ikeda H., Fukui T., Nakasone K., Fujita N., Sekine M., Takashina T., Nakamura S. Identification of carotinoids from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. *Frontiers in Microbiology*, 5 (100), p. 1-5, 2014.

ԱՃԻ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՔԱՐՎԱՃԱՌԻ
ԵՐԿՐԱԶԵՐՄԱՅԻՆ ԱՂԲՅՈՒՐԻՑ ՄԵԿՈՒՍԱՑՎԱԾ *THERMUS*
SCOTODUCTUS K1 ՇՏԱՄԻ ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ԿԱՐՈՏԻՆՈՒԴՆԵՐԻ

ԱՐՏԱԴՐՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԿԱԶՄԻ ՎՐԱ

Պողոսյան Հ.Լ., Փանոսյան Հ.Հ., Թռչունյան Ա.Հ.

ԵՊՀ, Կենսաքիմիայի, մանրէաբանության և
կենսատեխնոլոգիայի ամբիոն,
hpanosyan@ysu.am heghine.poghosyan2@ysumail.am

Կարոտինոիդները բույսերում, ջրիմուռներում, սնկերում և բակտերիաներում դեղինից մինչև կարմիր գունավորված ճարպալույծ գունակներ են, որոնք օգտագործվում են գունավոր նյութերի, շպարամիջոցների, սննդի և կերի, հակաօքսիդանտային և հակաքաղցկեղային դեղապատրաստուկների արտադրություններում [5, 8, 14]: Ի տարբերություն էուկարիոտների, բակտերիաները սինթեզում են ածխածնի ատոմների, կոնյուգացված կրկնակի կապերի, հիդրօքսիլ խմբերի ավելի մեծ պարունակությամբ կարոտինոիդներ՝ ոչ ֆերմենտային հակաօքսիդանտներ, որոնք ազոտի և թթվածնի ռեակտիվ տեսակների, հատկապես սինգլետ թթվածնի ձևերի և ոչ կենսաբանական ռադիկալների արդյունավետ քայքայիչներ են [8]: Այդ կարոտինոիդները հատկապես կարևոր են միջավայրի սթրեսային պայմանների նկատմամբ էքստրեմոֆիլ մանրէների կայունության մեխանիզմներում [11-13]: Դիցուք, *Deinococcus-Thermus* ֆիլումին պատկանող թերմոֆիլ մանրէներում ջերմային

սթրեսից պաշտասպանության մեխանիզմներից է ոչ ֆերմենտային հակաօքսիդանտների՝ կարոտինոիդների ակտիվ արտադրությունը [4, 13]: Ավելին, որոշ կարոտինոիդներ, օրինակ՝ թերմոգեաքսանտինները, մենահատուկ են միայն *Thermus* ցեղի տեսակներին [2, 3, 6, 7]: *T. filiformis*-ի օրինակով ցույց է տրվել, որ աճեցման պայմանները (ջերմաստիճան, pH) ազդում են կարոտինոիդների սինթեզի վրա [9]: Այդ թերմոֆիլ մանրէները ծառայում են արժեքավոր կարոտինոիդների ակտիվ արտադրիչներ [5, 8, 15]:

Ներկայացվող աշխատանքի նպատակն է եղել ուսումնասիրել ԼՂՀ Քարվաճառի երկրաջերմային աղբյուրից մեկուսացված աերոբ թերմոֆիլ բակտերիա *Thermus scotoductus* K1-ի ընդհանուր կարոտինոիդների տեսակարար ելքի և դրանց կազմի վրա աճեցման պայմանների (ջերմաստիճան, pH, օդավորում, լուսավորում) ազդեցությունը:

Նյութ և մեթոդ: Ուսումնասիրության նյութ է ծառայել ԼՂՀ Քարվաճառի երկրաջերմային աղբյուրից մեկուսացված և ֆենոտիպական հատկանիշների և ամբողջական գենոմի վերլուծության հիման վրա նույնականացված արեոբ թերմոֆիլ *Thermus scotoductus* K1 բակտերիական շտամը [10]: Մանրէային կուլտուրայի աճեցման և պահպանման համար կիրառվել է Բորկի և Ֆրիզի առաջարկած 0.1 % տրիպտոն, 0.5 % խմորասնկային մզվածք և միկրոտարբեր պարունակող սննդամիջավայրը [1]:

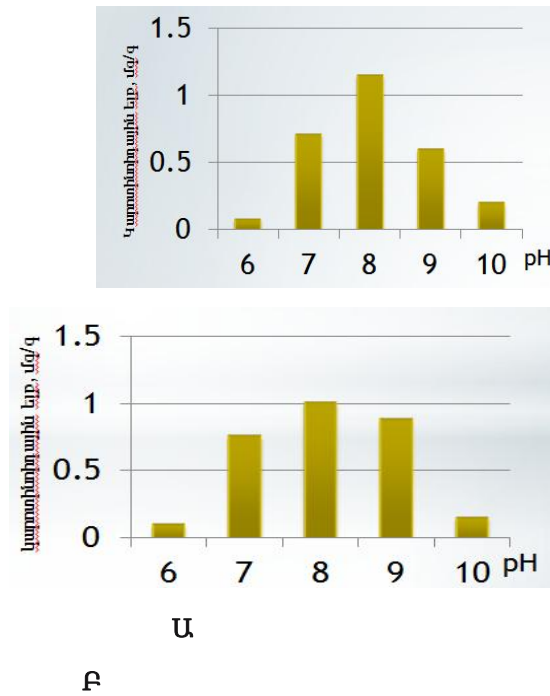
T. scotoductus K1-ի կենսազանգվածը և կարոտինոիդային ելքը աճեցման տարբեր պայմաններում որոշելու համար մանրէն աճեցվել է 55-70 °C տարբեր ջերմաստիճանային արժեքներում (5

°C միջակայքով), pH-ի 6-10 արժեքների տիրույթում (1 միջակայքով), օդավորմամբ (160 պտ/ր թափահարմամբ) և առանց օդավորման, բնական պարբերական լուսավորման և մթության պայմաններում: Մանրէները վերոհիշյալ պայմանների տարբեր համադրություններում աճեցվել են մինչև ուշ էքսպոնենցիալ փուլ, ապա բջջային կախույթը կենտրոնախուսվել է (9000 պտ/ր, 20 ր, 4 °C) և որոշվել ստացված կենսազանգվածի չոր քաշը:

Կարոտինոիդային գունանյութերի լուծամզման համար կենսազանգվածը 24 ժամ անընդհատ մագնիսկան խառնիչով թափահարվել է մթության պայմաններում սենյակային ջերմաստիճանում՝ օգտագործելով տարբեր լուծիչներ՝ մեթանոլ, ացետոն և էթանոլ: Լուծամզվածքը բջջային ջարդոնից առանձնացվել է կենտրոնախուսմամբ (12000 պտ/ր, 15 ր, 4 °C): Ստացված լուծամզվածքի կլանման սպետրը վերլուծվել է 400-700 նմ երկարությամբ ալիքների տիրույթում սպեկրտրալուսաչափմամբ (Termocicle Genesis10S): Կարոտինոիդային գունանյութերի չոր քաշի հաշվարկման համար լուծամզվածքները տեղադրվել է վակուումային չորանոցում (BOV-50 V, Biobase Meihua Trading, China) մինչև լուծիչի ամբողջական ցնդելը:

Կարոտինոիդների տեսակարար (արտադրողական) ելքը հաշվարկվել է ստացված ընդհանուր կարոտինոիդային գունանյութերի և կենսազանգվածի չոր քաշերի հարաբերությամբ: Փորձնական արդյունքների տվյալները երեք անկախ փորձերի միջինն են:

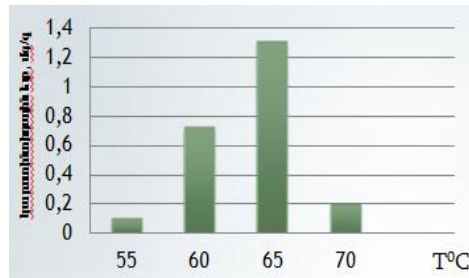
Արդյունքներ և քննարկում: Օպտիմալ ջերմաստիճանային պայմաններում (65 °C), սակայն pH-ի տարբեր արժեքներում օդավորմամբ և առանց դրա աճեցնելիս *T. scotoeductus* K1-ի ընդհանուր կարոտինոիդային նյութերի ելքի որոշման արդյունքները ներկայացված են նկար 1-ում:



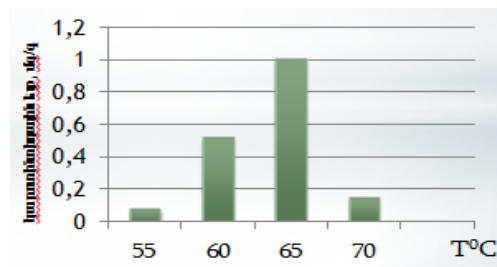
Նկար 1. *T. scotoeductus* K1-ի կարոտինոիդային նյութերի ելքը 65 °C, pH-ի տարբեր արժեքներում, մթության պայմաններում, օդավորմամբ (Ա) և առանց օդավորման (Բ):

Ինչպես երևում է նկար 1-ից կարոտինոիդային նյութերի տեսակարար առավելագույն ելքը նկատվում է օդավորման և pH 8 պայմաններում՝ կազմելով 1.3 մգ/գ: Կարոտինոիդային նյութերի տեսակարար ելքը (1.01 մգ/գ) բարձր է եղել նաև առանց թափահարման և pH 8 պայմաններում, սակայն այն 1.28 անգամ զիջում է օդավորման պայմաններում նույն ցուցանիշին:

Կարոտինոիդային նյութերի ելքը մթության մեջ pH 8 արժեքում, բայց տարբեր ջերմաստիճանային արժեքներում, օդավորման և առանց թափահարման պայմաններում ներկայացված է նկար 2-ում:



Ա



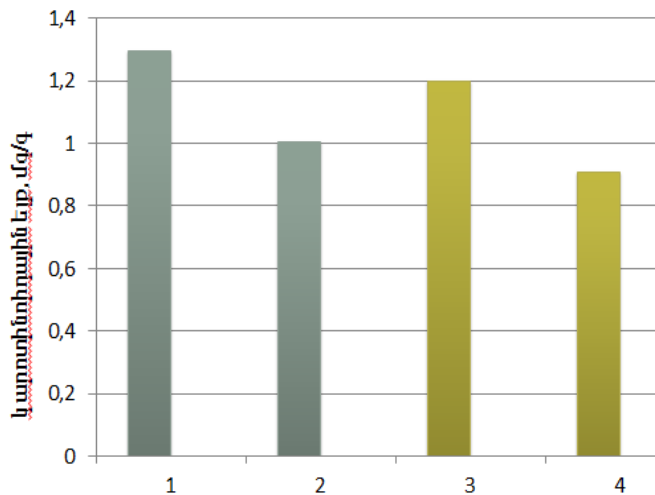
Բ

Նկար 2. *T. scotoductus* K1-ի կարոտինոիդային ելքը pH-8, տարբեր ջերմաստիճանային արժեքներում, մթության, օդավորման (Ա) և առանց թափահարման (Բ) պայմաններում:

Ստացված արդյունքները վկայում են, որ կարոտինոիդների առավելագույն ելքը (1.3 մգ/գ) համընկնում է աճի ջերմաստիճանային օպտիմումին (65 °C): Առանց թափահարման պայմաններում առավելագույն արժեքը դրսևորվում է նույնպես աճի օպտիմալ ջերմաստիճանում, սակայն ավելի քան 77.6 %-ով զիջում է օդավորման պայմաններում նույն ցուցանիշին:

Ջերմաստիճանային և pH-ի օպտիմալ արժեքի պայմաններում և օդավորման ու առանց դրա համադրությամբ

կուլտուրայի աճեցման դեպքում կարոտինոիդային գունանյութերի էլքի վրա լույսի խթանիչ ազդեցության ուսումնասիրության արդյունքները ամփոփված են նկար 3-ում: Կարոտինոիդային նյութերի տեսակար էլքը լուսավորմամբ թե՛ օդավորման, և թե՛ առանց թափահարման պայմաններում բարձր է՝

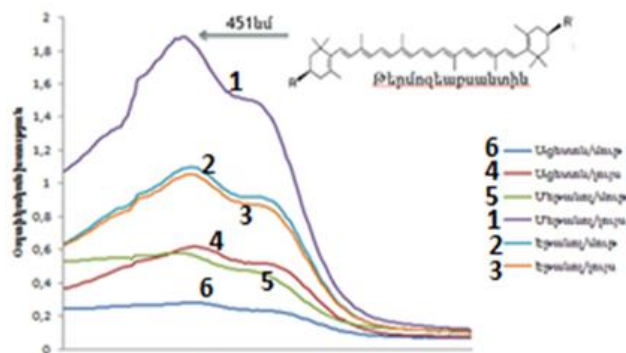


Նկար 3. *T. scotoductus* K1-ի կարոտինոիդային նյութերի էլքը, pH-ի և ջերմաստիճանային օպտիմալ արժեքի, օդավորմամբ մթության (1) և լույսի (3) , առանց թափահարմամբ մթության (2) և լույսի (4) պայմաններում:

կազմելով համապատասխանաբար 1.2 և 0.91 մգ/գ: Ստացված տվյալների համադրությունը թույլ է տալիս եզրակացնել, որ կարոտինոիդների էլքը բարձր է օդավորման պայմաններում: Դա կարելի է բացատրել կարոտինոիդային նյութերի սինթեզի վրա թթվածնի մակաձիչ ազդեցությամբ: Սակայն կարոտինոիդների էլքը չի փոխվում լուսավորման պայմաններում մանրէների

աճեցման դեպքում, չնայած հայտնի է, որ լույսը ևս մակածիչ ազդեցություն է դրսևորում կարոտինոիդների սինթեզի վրա: Այսպիսով, ցույց է տրվել, որ *T. scotoeductus* K1-ի կարոտինոիդային նյութերի առավելագույն ելքը ապահովվում է անկախ լուսավորումից pH 8, 65 °C ջերմաստիճանային արժեքում, օդավորման պայամաններում:

T. filiformis-ի կարոտինոիդների առավելագույն արտադրությունը աճի նույն պայամաններում կազմում է 1.5 մգ/գ՝ 0.658 գ/լ կենսազանգվածի պարագայում [9]: Իհարկե *T. scotoeductus* k1-ի կարոտինոիդային արտադրողականությունը 1.15 անգամ զիջում է *T. filiformis*-ի նույն ցուցանիշին, սակայն հարկ է նշել, որ կարոտինոիդների արտադրողականությունը (1.3 մգ/գ) դիտվում է կրկնակի պակաս կենսազանգվածի պարագայում (0.3 գ/լ): Ավելին *T. filiformis*-ի նման արտադրողականությունը ապահովվել է միջավայրում ածխածնի և ազոտի աղբյուրների բարելավված պայամաններում:



Նկար 4. Մթության և լուսավորման պայամաններում աճեցված *T. scotoeductus* K1-ի բջիջների տարբեր լուծիչներով (ացետոն, մեթանոլ, էթանոլ) լուծամզվածքների կլանման սպեկտրը:

Լուսավորման և մթության պայմաններում տարբեր լուծիչներով կարոտինոիդային նյութերի լուծամզվածքների սպեկտրի որոշման արդյունքները զետեղված են նկար 4-ում:

Ինչպես երևում է նկար 4-ից կենսազանգվածից կարոտինոիդային գունանյութերի առավելագույն լուծամզում նկատվում է մեթանոլային լուծիչի դեպքում: Գունանյութերը մեթանոլային լուծամզվածքում ցույց են տվել 430, 451, 463 և 477 կլանման գագաթներ: Համեմատելով նույն տեսակի մանրէների համար հայտնի կարոտինոիդային լուծամզվածքների կլանման սպեկտրները, կարելի է ենթադրել, որ 451 նմ ալիքի կլանման գագաթով կարոտինոիդային նյութը թերմոգեաքսանտինն է [9]: Նկար 4-ից ակնհայտ է, որ լուսային պայմաններում մանրէները աճեցնելիս մակաձվում է տարբեր կարոտինոիդային նյութերի սինթեզը: Էթանոլային լուծիչի կիրառման դեպքում կարոտինոիդների լայն սպեկտրը դիտվում է նաև մթության պայմաններում կուլտուրան աճեցնելիս: Այսպիսով, թեև կարոտինոիդային նյութերի ելքը կապված չէ լուսավորման պայմաններից, լուսավորումը ազդում է կարոտինոիդների կազմի վրա:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Brock T.D., Freeze H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. J. Bacteriol., 98, p. 289-297, 1969.
2. Carreto L., Wait R., Nobre F., Costa M.S. Determination of the structure of a novel glycolipid from *Thermus aquaticus* 15004 and demonstration that hydroxyl fatty acids are amide linked to glycolipids in *Thermus* spp. J. Bacteriol., 178, p. 6479–6486, 1996.
3. Cava F., Hidalgo A., Berenguer J. *Thermus thermophilus* as biological model. Extremophiles, 13, p. 213–231, 2009.

4. da Costa M.S., Rainey F.A., Nobre M.F. The genus *Thermus* and relatives. *Prokaryotes*. New York, Springer, 7, p. 797-812, 2006.
5. Hádá M., Nagy V., Deli J., Agócs A. Hydrophilic Carotenoids: Recent Progress *Molecules*, 17, p. 5003-5012, 2012.
6. Hoshino T., Yoshino Y., Guevarra E.D., Ishida S., Hirutaa T., Fujiia R., Nakahara T. Isolation and partial characterization of carotenoid underproducing and overproducing mutants from an extremely thermophilic *Thermus thermophilus* HB27. *J. Ferment. Bioeng.*, 77, p. 131-136, 1994.
7. Leone S., Molinaro A., Lindner B., Romano I., Nicolaus B., Parrilli M., Lanzetta R., Holst O. The structures of glycolipids isolated from highly thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* Samu-SA1. *Glycobiology*, 16, p. 766-775, 2006.
8. Mandelli F., Miranda V. S., Rodrigues E., Mercadante A.Z. Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28, p. 1781-1790, 2012.
9. Mandelli F., Yamashita F., Pereira J.L., Mercadante A.Z. Evaluation of biomass production, carotenoid level and antioxidant capacity produced by *Thermus filiformis* using fractional factorial design. *Brazilian Journal of Microbiology*, p. 126-134, 2012.
10. Saghatelyan A., Poghosyan L., Panosyan H., Birkeland N-K. Draft genome sequence of *Thermus scotoductus* strain K1, isolated from a geothermal spring in Karvachar, Nagorno Karabakh. *Genome Announc.*, 3(6):e01346-15, 2015.
11. Stahl W., Sies H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1740, p. 101-107, 2005.
12. Stan-Lotter H., Fendrihan S. *Adaption of Microbial Life to Environmental Extremes: Novel Research Results and Application*. Springer, 2012.
13. Tian B., Hua Y. Carotenoid biosynthesis in extremophilic Deinococcus-Thermus bacteria. *Trends in Microbiology*, 18 (11), p. 512-520, 2010.
14. Viñchez C., Forján E., Cuaresma M., Beđmar F., Garbayo I., Veja J.M. Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. *Mar. Drugs*, 9, p. 319-333, 2011.
15. Yokoyama A., Shizuri Y., Hoshino T., Sandmann G. Thermocryptoxanthins: novel intermediates in the carotenoid biosynthetic pathway of *Thermus thermophilus*. *Arch. Microbiol.*, 165, p. 342-345, 1996.

ТАУРИН И АЛКОГОЛЬ: ВЛИЯНИЕ ТАУРИНА НА КЛЕТОЧНЫЕ СТРУКТУРЫ МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ АЛКОГОЛИЗАЦИИ

Даниелян М.А.¹, Хачатрян В.П.¹, Саваян А.А.¹, Абраамян С.С.²,
Назарян О.А.¹, Карапетян К.В.¹, Гевондян Т.А.¹

¹Институт физиологии им.Л.А.Орбели НАН, Ереван, Армения

²Институт биохимии им. Г. Бунятыана НАН, Ереван, Армения

Ключевые слова: алкогольная интоксикация, мозг, нейроны, капилляры, таурин

Введение

Как известно, этанол влияет на функцию мозга, взаимодействуя с многочисленными нейромедиаторными системами, приводя к неустойчивому равновесию между тормозными и возбуждательными нейромедиаторами. Острая алкогольная интоксикация изменяет активность всех моноаминергических нейромедиаторных систем [6]. Кратковременное воздействие алкоголя сдвигает баланс в сторону тормозных влияний, длительное же применение алкоголя наклоняет его в сторону равновесия (регистрируемые мозговые потенциалы дают компенсацию). Этанол легко всасывается в желудочно-кишечном тракте и проникает из кровяного русла в мозг, взаимодействуя с нервными клетками. Клеточные мембраны представляют собой барьер, ограничивающий внутриклеточную среду от внеклеточной, который избирательно регулирует проникновение в клетку отдельных ионов, воды и других молекул. Однако, клеточные мембраны легко проницаемы для этанола. Алкоголь дестабилизирует мембрану нервных клеток, изменяя физические свойства ее липидных компонентов таким образом, что повышается “жидкость” мембраны [12]. Результаты

морфометрических исследований свидетельствуют о селективности алкогольного поражения мозга. Так, кортиколимбическая область мозга наиболее чувствительна к алкоголь-вызванной дегенерации [10]. Патологическое состояние при интоксикации алкоголем на начальных этапах характеризуется возникновением эйфории и возбуждения, которые являются признаками ослабления тормозных механизмов. При воздействии алкоголя микросуды - главные компоненты гематоэнцефалического барьера, уязвимы к окислительному повреждению, вызванному активированием оксидазы NADPH и синтезом азотной окиси (индуцированное ацетальдегидом) в микросудах мозга [7]. Таурин и его производное акампросат (Са-ацетилгомотаурин) способны снижать тягу к потреблению этанола у людей и экспериментальных животных [11; 13]. В головном мозге таурин играет интегральную роль в таких физиологических процессах, как осморегуляция, нейропротекция, нейромодуляция [11]. Он известен как положительный модулятор Cl^- -каналов в составе ГАМК_A-ергических и глицинергических рецепторов и отрицательный модулятор возбуждающих NMDA-рецепторов и Ca^{2+} -каналов. Таурин способен корректировать стимулирующий и мотивационные эффекты этанола дозозависимым образом [16]. Клинические исследования продемонстрировали, что применение таурина у испытуемых, употреблявших этанол, приводило к снижению содержания ацетальдегида в крови по сравнению с контрольной группой, не получавшей препарат [18], то есть таурин помогает организму избежать те негативные последствия, которые возникают при изъятии алкоголя. По данным зарубежных исследователей, назначение таурина больным алкоголизмом на первых стадиях детоксикации приводило к улучшению их общего состояния [17].

Таурин оказывает общий угнетающий эффект на центральную нервную систему (ЦНС) и, по мнению целого ряда исследователей, обладает большинством признаков нейромодулятора, тормозящего синаптическую передачу [3], и обладает антиоксидантным, мембраностабилизирующим действием [5; 8]. Поэтому целью нашего исследования явилось выявление протекторного эффекта таурина на морфофункциональное состояние клеточных структур коры мозга крыс, подвергнутых кратковременной алкогольной интоксикации.

Материал и методы исследования.

Исследования проводили на 25 половозрелых крысах–самках Альбино, массой 200–250 гр. Животные были подразделены на контрольную (получающие воду) и 2 опытные группы (по 5 животных в каждой группе). Все экспериментальные животные находились на сухом корме и в качестве единственного источника жидкости в течение 10 дней получали 15% раствор этанола. Для изучения влияния таурина на клеточные структуры мозга крыс после хронической алкоголизации животным непосредственно после прекращения приема алкоголя в течение 7-и дней каждый день вводили водный раствор таурина (50 мг/кг веса, в/б).

С целью изучения морфофункционального состояния клеточных структур мозга был применён гистохимический метод выявления активности Ca^{2+} -зависимой КФ [2], разработанный на базе метода Гомори. Было проведено морфогистохимическое изучение префронтальной коры больших полушарий крыс. Для выявления внутримозгового микроциркуляторного русла и морфометрических исследований был использован кальций аденозинтрифосфатный безинъекционный гистоангиологический метод Чилингаряна [9]. Животные были наркотизированы нембуталом (40-45 мг/кг веса,

внутрибрюшинно) с последующим изъятием мозга. Были проготовлены замороженные фронтальные срезы головного мозга толщиной 40 мкм, которые подвергались дальнейшей обработке в соответствующих инкубационных смесях. Готовые препараты подвергались морфологическому и морфометрическому анализу (проводилось измерение диаметра капилляров окулярным микрометром под светооптическим микроскопом (ок.15, об.40)). Морфометрию проводили в префронтальной коре (ПФК) больших полушарий мозга, исходя из того, что данная область наиболее уязвима к алкогольной интоксикации. Средний диаметр (d) капилляров выводили из 100 измерений, выполненных на срезах мозга каждого животного. Статистическая обработка цифровых данных проводилась с использованием t-критерия Стьюдента. Последующие съемки препаратов производились с помощью OPTON фотоаппарата М-35 и с помощью фотонасадки AmScore MU800 через микроскоп OPTON (West Germany).

Результаты и обсуждение

На фронтальных срезах коры больших полушарий мозга интактных крыс выявляются клетки всех слоев, из которых наиболее интенсивно окрашиваются нейроны внутреннего пирамидного слоя. Главными и наиболее характерными элементами являются коническое тело пирамидных нейронов, обращенное вершиной к поверхности, а также переходящее в толстый "верхушечный", радиально направленный дендрит (Рис. 1 А). Наиболее интенсивно окрашивается цитоплазма клетки у места отхождения основного дендрита. У крупных пирамидных клеток этот отросток, пройдя некоторое расстояние от тела, в основном раздваивается. От окружности основания каждой из пирамид отходят несколько коротких и тонких боковых дендритов. Аксон

обыкновенно начинается от середины основания и идет вниз, к белому веществу. Осадок фосфата свинца в пирамидных нейронах наблюдается в виде крупных гранул, а в цитоплазме клеток зернистого слоя он распылен (Рис. 1 В). Интенсивно окрашиваются также нейроны полиморфного слоя, где встречаются треугольные, веретенообразные, многоугольные, круглые клетки с короткими отростками (Рис. 1 Б).

При кратковременном приеме 15% раствора этанола (в течение 10 дней) поражение ПФК мозга затрагивает, прежде всего, сомату и отростки нервных клеток. Анализ распространенности процесса в глубину и вдоль мозговой коры показал, что под влиянием 15%-ого этанола во всех слоях ПФК мозга выявляются грубые дегенеративные процессы. В пирамидном слое, помимо некоторых уцелевших клеток с нормальной морфологией, в большинстве случаев, встречаются сморщенные, потерявшие свою характерную форму клетки (Рис. 1 Г). Часть нейронов теряет ориентацию отростков, а толстый "верхушечный", радиально направленный дендрит не выявляется. В полиморфном слое (Рис. 1 Д) характерным морфологическим признаком являются "пробелы", характеризующиеся исчезновением реакции нейронов. В зернистом слое коры мозга морфологическая картина соответствует острой клеточной болезни Ниссля. В цитоплазме набухших нейронов, лишенных отростков, с центральной части клеточного тела наблюдается постепенное исчезновение гранулярного осадка и клетки уподобляются шарам, окаймленным тонким слоем осадка (Рис. 1 К). Во внутреннем зернистом слое коры в ранние сроки воздействия 15%-ого этанола обнаруживаются клетки с центрально расположенными светлыми ядрами и кольцевидным подмембранным расположением КФ (Рис. 1 Е).

Таким образом, для ранних сроков алкоголизации 15%-ым раствором этанола характерным являются глубокие нейродегенеративные процессы, которые затрагивают нейроны внутреннего зернистого и полиморфного слоев, а в пирамидном слое выявляются сморщенные нейроны с центральным хроматолизом. Полученные данные согласуются с данными ряда авторов, которые признаком острого алкогольного повреждения нервных клеток считают ишемическое сморщивание последних, наиболее выраженное в коре лобной доли головного мозга [4].

У крыс, получивших таурин в течение 7-и дней после алкогольной интоксикации (в течение 10 дней), “пробелов” в клеточной реакции коры больших полушарий мозга не наблюдается, наблюдается увеличение плотности расположения нейронов, восстановление слоистости коры (Рис. 1 Ж-И). Во внутреннем зернистом, полиморфном и пирамидном слоях восстанавливаются размеры и форма клеток, у которых реагируют отростки и отчетливо выделяется клеточная оболочка. В цитоплазме нейронов появляются зёрнышки осадка фосфата свинца, однако эти зёрна длиннее и тоньше. Они образуют спиралевидные или глыбчатые образования, что характерно для первично раздражённых нейронов, находящихся на пути к восстановлению. Кроме того, наблюдается разница в интенсивности окрашивания клеток, а именно, встречаются как тёмноокрашенные клетки с высокой фосфатазной активностью (Рис. 1 Ж, З), так и нейроны, в цитоплазме которых на светлом фоне выделяются Гомори-позитивные гранулы (Рис. 1 И). Изредка можно встретить нейроны с незначительно выраженным хроматолизом (Рис. 1 Ж, И). Во внутреннем пирамидном слое отмечается высокая

фосфатазная активность в нейронах, у которых реагируют утолщённые апикальные дендриты с правильной радиальной ориентацией и боковые ветвления с менее интенсивной окраской (Рис. 1 Ж). В зернистом слое не наблюдается полной картины восстановления формы и размеров нейронов, они всё ещё несколько деформированы, но контуры клеток становятся чёткими, выявляются отростки. Хроматолиз в зернистых клетках не обнаруживается, в цитоплазме появляется мелкая грануляция и светлые ядра клеток, занимающие центральное положение (Рис. 1 И).

Итак, результаты исследований дают основание предположить, что при систематическом введении таурина в течение 7-и дней после 10-и дневного приема 15% раствора этанола наблюдаются положительные изменения структурных свойств нейронов коры больших полушарий. По сравнению с отравленными алкоголем крысами, у животных с введением таурина отмечается восстановление слоистости коры мозга, демонстрируется регенерация клеток, восстанавливаются форма и размеры клеток, отростки их удлиняются и утолщаются. Отчётливо выделяется клеточная оболочка, ядра занимают центральное положение. При приёме таурина наблюдается повышение активности КФ (повышение метаболизма), усиление процессов фосфорилирования в коре, что в конечном итоге служит обеспечению оптимальных условий для процессов клеточного выживания и регенерации.

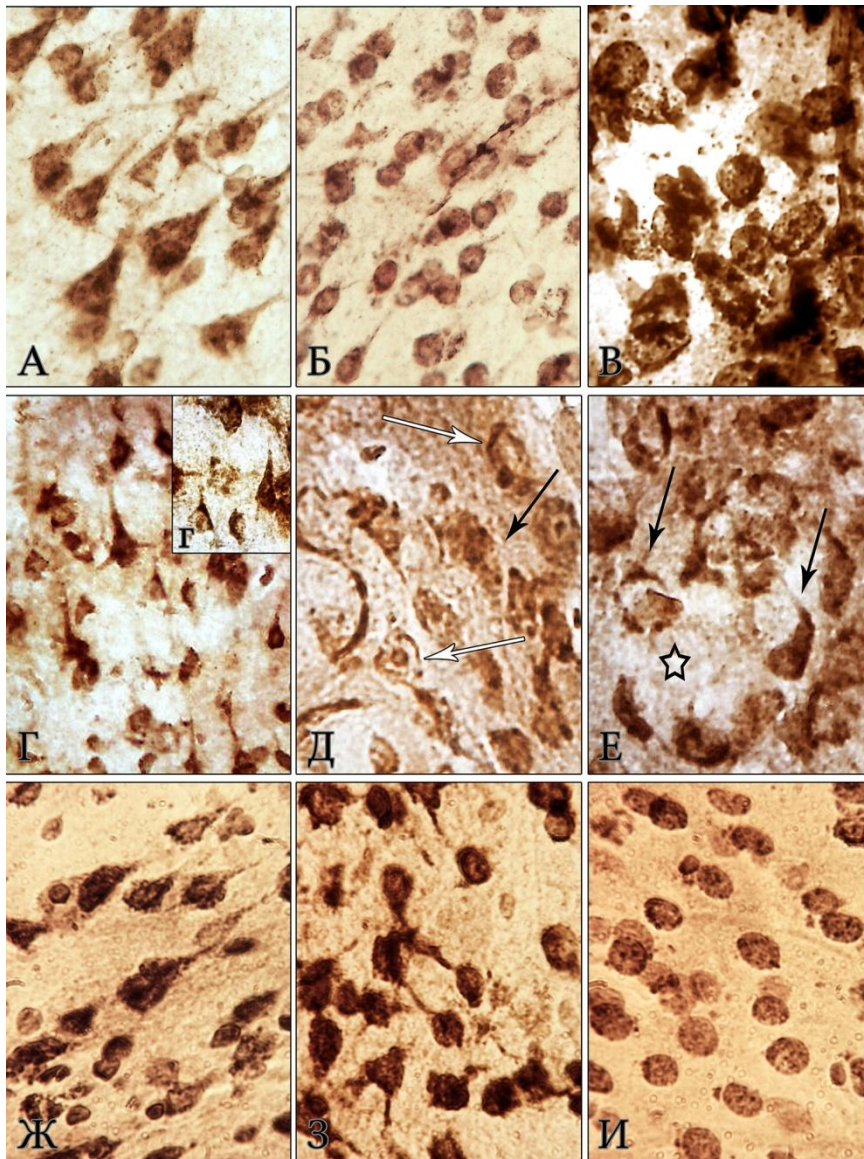


Рис. 1. Микрофотографии нейронов префронтальной коры мозга крыс в ранние сроки алкоголизации (А-В – норма; Г-Е - под воздействием 15%-ого этанола; Ж-И - под воздействием 15%-ого этанола в сочетании с последующим приемом таурина; четко продемонстрирован центральный хроматоллиз (черные стрелки), подмембранное расположение КФ (белые стрелки), и клетки “тени” (звездочка); А, Г, з, Ж – внутренний пирамидный, Б, Д, З - полиморфный, В, Е, И- внутренний гранулярный слой).

Увеличение: ×400 (Г); ×1000 (А, В, з, Д, Е, Ж, З, И).

Помимо морфогистохимического исследования, проводился морфометрический анализ калибров капилляров ПФК головного мозга. При кратковременной алкоголизации организация кровеносного русла коры в большинстве случаев сохраняла основные закономерности конструкции. Однако, визуальная оценка макропрепаратов показывает геморрагическое пропитывание, обусловленное значительными изменениями микрососудов. Вокруг отдельных капилляров, посткапилляров и венул определяются локальные геморрагии. Последнее соответствует результатам исследований, согласно которым алкоголь является фактором риска для кровоизлияния в мозг [14]. У всех крыс с алкогольной интоксикацией, в отличие от контрольных, на микропрепаратах наблюдалось значительное сужение капилляров ПФК головного мозга. В некоторых же областях мозга демонстрируются зоны, содержащие малое количество сосудов, или же зоны, в которых они вовсе отсутствуют (Рис. 2 В).

Данная ангиоархитектоника обеспечивает быструю скорость кровотока и, следовательно, интенсивные обменные процессы в коре. Анализ данных показал, что у интактных животных средний диаметр основной массы капилляров ПФК больших полушарий составляет $d=6.1\pm 0.22$ мкм, то есть они свободно проходимы для форменных элементов и плазмы крови. Первой реакцией на введение 15%-ого этилового спирта явилось резкое сужение просвета капилляров на третьей сутки на 40,1% ($d=3.59\pm 0.12$ мкм) (Рис. 2 В, Г). В последующем, через 10 дней после алкоголизации сильный спазм сменялся умеренным расширением диаметра капилляров, в сравнении с нормой сужение составляло 31.4% ($d=4.12\pm 0.43$ мкм).

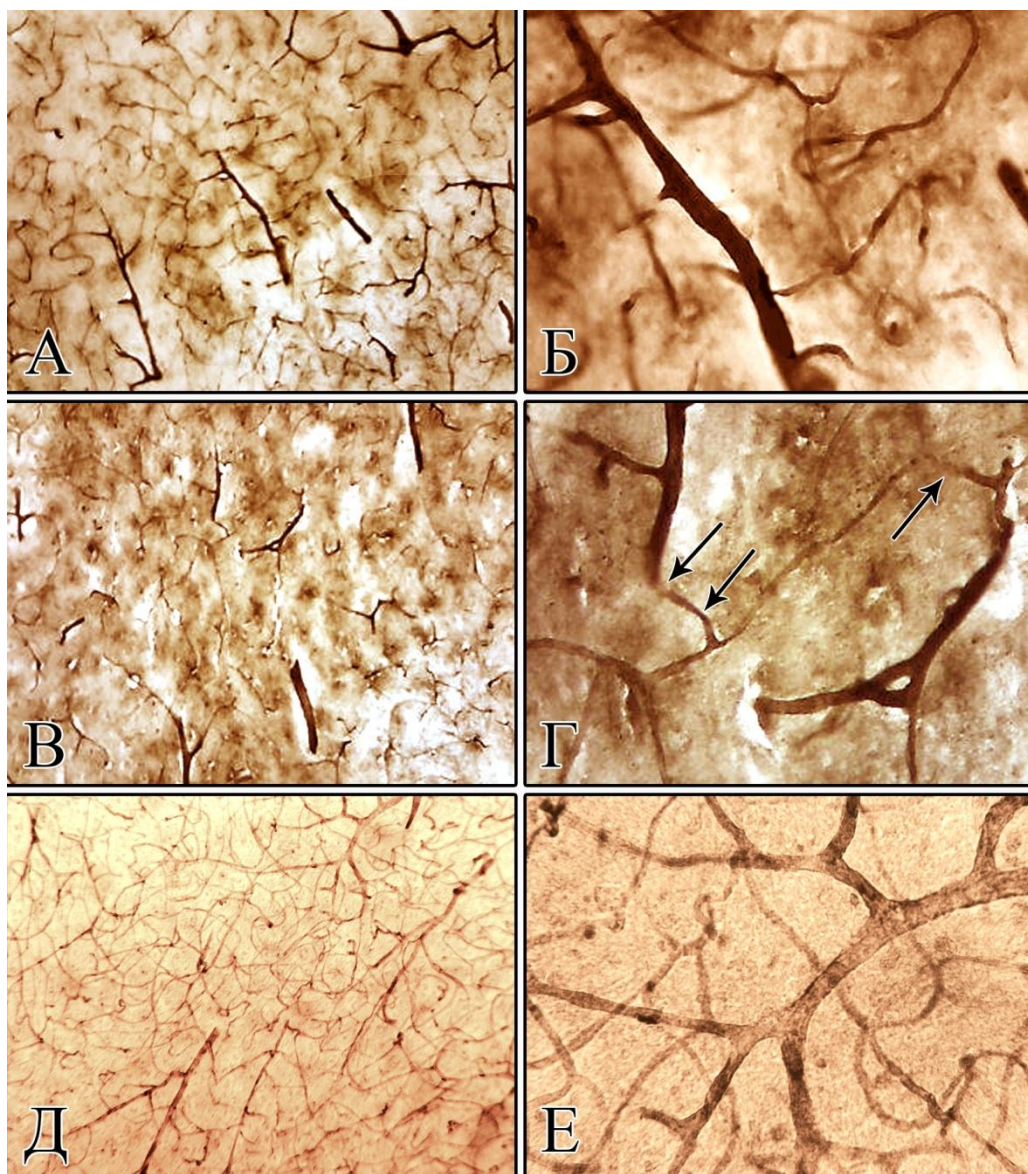


Рис. 2. Микрофотографии капиллярного звена микроциркуляторного русла префронтальной коры мозга крыс. А, Б – норма; В-Г – ранние сроки алкогольной интоксикации, видны участки с суженными сосудами (стрелки); Д, Е – при воздействии таурина очевидно почти полное восстановление сосудистой сети.

Увеличение: $\times 100$ (А, В, Д); $\times 400$ (Б, Г, Е).

Сужение капилляров в первые дни после приема алкоголя связано с активацией симпатoadреналовой системы. Наблюдаемая затем дилатация капилляров является следствием действия гистамина,

вызванного выбросом и дегрануляцией тучных клеток посредством активации кортикотропин нейротензина и субстанции P [15].

Анализ данных морфометрического изучения влияния таурина на капилляры ПФК мозга крыс после алкогольной интоксикации в динамике показал, что при введении данной аминокислоты после 10 дней приема 15% раствора этанола показатели диаметра капилляров приближаются к норме, и сужение составляет 4.16% ($d=5.76\pm 0.55$ мкм), в сравнении с нормой. Данные ряда исследований говорят о том, что таурин положительно влияет на структуру и эндотелиальную функцию сосудов, что обусловлено, по крайней мере, частично, восстановлением экспрессии NO-синтазы [3]. Полученные данные указывают на сосудорасширяющий и ангиопротекторный эффекты таурина на капиллярное звено микроциркуляторного русла мозга крысы.

Заключение

Таким образом, при кратковременной алкоголизации 15%-ным раствором этанола наблюдаются нейродегенеративные процессы, которые затрагивают нейроны внутреннего гранулярного, полиморфного и пирамидного слоев коры большого полушария мозга крыс. Описанные морфологические изменения микроциркуляторного русла указывают на резкое возрастание изменений как количественно, так и качественно с применением алкоголя с высокой концентрацией спирта. При введении таурина в течение 7-и дней после кратковременного приема 15% раствора этанола отмечаются положительные сдвиги в морфологической картине нейронов ПФК мозга, а диаметр капилляров данной области коры мозга крыс

приближается к норме, то есть благодаря таурину при ранней терапии происходит ускорение компенсаторно-приспособительных механизмов, и организм животного легче и быстрее выходит из состояния алкогольного опьянения.

Таким образом, полученные результаты указывают на эффективность и перспективность использования аминокислоты таурина в качестве метаболической терапии при лечении алкоголизма и его последствий. Анализ данных литературы [1] позволяет предположить, что механизм корригирующего влияния таурина на метаболические нарушения реализуется через торможение процессов перекисного окисления липидов в клеточной мембране и стабилизацию биомембран, активацию антиокислительной активности, нормализующее влияние на пул таурина в тканях и органах. Данные, полученные в результате параллельно проведённых нами морфо-функциональных и морфометрических исследований, подтверждают друг друга и указывают на положительное (нейро- и ангиопротекторное) действие таурина на клеточные структуры коры головного мозга крыс, подвергнутых кратковременной алкогольной интоксикации.

Список литературы

1. Козловский А.В., Лелевич В.В., Виницкая А.Г., Курбат М.Н., Лелевич С.В. Аминокислоты и их производные в коррекции метаболических нарушений при наркологических заболеваниях // Медицинские новости, 2004, №7, с. 27-33.
2. Меликсетян И.Б. Выявление активности Ca^{2+} зависимой кислой фосфатазы в клеточных структурах мозга крыс /Морфология, 2007, т. 131(2), с. 77-80.

3. Нефёдов Л.И. Таурин (биохимия, фармакология и медицинское применение) / НАН Б., Гродно, 1999, 145с.
4. Пиголкин Ю.И., Богомолова И.Н., Богомолов Д.В. Судебно-медицинская диагностика отравлений спиртами / М.: Медицинское информационное агентство, 2006, 576 с.
5. Поздеев В.К. Метаболическая терапия эпилепсии / Псков: Стерх, 1995, 140с.
6. Шабанов П.Д., Калишевич С.Ю. Биология алкоголизма / СПб., «Лань», 1999, 272с.
7. Alikunju S., Abdul Muneer P.M., Zhang Y., Szlachetka A.M., Haorah J. The inflammatory footprints of alcohol-induced oxidative damage in neurovascular components. / *Brain Behav Immun.*, 2011, v. 25, Suppl 1, p. 129-136.
8. Azuoma I., Halliwell B., Haey B.M. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their precursors / *Biochem.J.*, 1988, v. 256, № 1, p. 251-255.
9. Chilingaryan A., Chilingaryan A.M., Martin G.G. The three-dimensional detection of microvasculatory bed in the brain of white rat *Rattus norvegicus* by a Ca²⁺-ATPase method / *Brain Research*, 1070 (2006), p. 131 – 138.
10. Diana M., Peana A.T., Sirca D., Lintas A., Melis M., Enrico P. Crucial role of acetaldehyde in alcohol activation of the mesolimbic dopamine system / *Ann N Y Acad Sci.*, 2008, v. 1139, p.307-317.
11. Olive M.F. Interactions between taurine and ethanol in the central nervous system / *Amino Acids.*, 2002, v. 23, № 4, p. 345-357.
12. Park J.S., Choi E.J., Jeong D.S., Yang H.J., Kim K.P., Son K.K., Lee H.W., Kang M.J, Kim S.M., Chung I.K., Bae M.K., Jang H.O., Yun I. Effects of dimyristoylphosphatidylethanol and ethanol on thickness of neuronal membrane lipid bilayers / *Arch Pharm Res.*, 2009, v. 32, № 10, p. 1469-1473.
13. Rammes G., Mahal B., Putzke J., Parsons C, Spielmanns P, Pestel E, Spanagel R, Zieglgänsberger W, Schadrack J. The anti-craving compound acamprosate acts as a weak NMDA-receptor antagonist, but modulates NMDA-receptor subunit expression similar to memantine and MK-801 / *Neuropharmacology*, 2001, v. 40, № 6, p. 749-760.
14. Suzuki K., Izumi M. Alcohol is a risk factor not for thalamic but for putaminal hemorrhage: the Akita Stroke Registry / *J Stroke Cerebrovasc Dis.*, 2013 Oct., v. 22(7), p. 1064-9.
15. Ueyama T., Yoshida K., Senba E. Emotional stress induces immediate-early gene expression in rat heart via activation of alpha- and beta-adrenoreceptors / *Am.J.Physiol.*, 1999, v. 277, № 4, p. 1553-1561.

16. Ward R.J., Colantuoni C., Dahchour A., Quertemont E., De Witte P. Acetaldehyde-induced changes in monoamine and amino acid extracellular microdialysate content of the nucleus accumbens / *Neuropharmacology*, 1997, v. 36, № 2, p. 225-232.
17. Ward R.J., Martinez J., Ball D., Marshall EJ, De Witte P. Investigation of the therapeutic efficacy of a taurine analogue during the initial stages of ethanol detoxification: preliminary studies in chronic alcohol abusers / *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2000, v. 483, p. 375-381.
18. Watanabe A., Hobara N., Kobayachi M., Nagashima H. / *Res. Commun. Subst. Abuse*, 1985, v.6, № 4, p. 247-250.

Список сокращений: ПФК - префронтальная кора, КФ- кислая фосфатаза, ЦНС- центральная нервная система, NADPH- никотинамидадениндинуклеотидфосфат, ГАМК - гамма-аминомасляная кислота , NMDA - N-метил-D-аспарагиновая кислота.

К ОБМЕНУ НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА И ПАНКРЕАСА В НОРМЕ И ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМ ДИАБЕТЕ

Тароян С.К., Хачатрян Р.С., Хачатрян Н.Х.,
Варданян А.Г., Камалян Р.Г.

Институт биохимии им. Г.Бунятыана НАН РА

Введение

Известно, что островковые β -клетки содержат сравнимые с мозгом количества нейроактивных аминокислот и ферменты их синтеза и утилизации [6,7,9,18-20]. В последние годы в связи с регуляторной ролью ГАМК в процессах функционального взаимодействия различных островковых клеток поджелудочной железы и системной аутоиммунной реакции организма [11,12,15,17] с этой аминокислотой связывают перспективы лечения диабета [21-23]. В наших опытах было показано заметное протекторное противогликемическое действие совместного внутрибрюшинного введения крысам генерирующих ГАМК агентов (глутамин и этаноламин-О-сульфат), сопровождающееся определенными сдвигами в содержании нейроактивных аминокислот мозга и поджелудочной железы [4].

Следует отметить, что данные о связи обмена дикарбоновых аминокислот и ГАМК и продукцией инсулина неоднозначны. Наряду с исследованиями о самостоятельном влиянии нейроактивных аминокислот на синтез и секрецию инсулина имеются также данные о зависимости их действия от активаторов глутаматдегидрогеназы, в частности лейцина, который многократно усиливает, например,

действие глутамина на секрецию инсулина [10]. Авторы выдвигают гипотезу взаимодействия ряда ферментов цикла Кребса с глутаматдегидрогеназой с усилением выхода α -кетоглутарата и восстановленных пиридиндинуклеотидов, способствующих опосредованно генерации инсулина и его секреции. Показано также стимулирующее влияние глюкагоноподобного пептида-I на синтез и секрецию ГАМК β -клетками панкреаса на уровне глутаматдекарбоксилазы, но не ГАМК-Т [24], что поддерживает в условиях запускаемого глюкозой внутриклеточного расщепления ГАМК, опосредуемого последней влияния β -клеток на соседние островковые клетки. Вместе с тем большинство данных свидетельствует о самостоятельном влиянии как ГАМК, так и ее предшественника глутамина на процессы, связанные с синтезом и секрецией инсулина [4, 18, 20]. Исходя из известных данных об алкилировании митохондриальной ДНК и нарушении митохондриальных реакций при стрептозотоциновом диабете [16] нами была исследована утилизация глутамата и ГАМК в митохондриях мозга и поджелудочной железы в норме и при стрептозотоциновом диабете.

Материалы и методы

Опыты проводили на белых крысах-самцах массой 180-200 г. Животные содержались на обычном пищевом рационе в условиях вивария Института биохимии НАН РА. В качестве диабетогена использовали стрептозотцин, который вводили внутривентриально в дозе 50 мг/кг веса в 1 мл цитратного буфера. Интактным крысам вводили в том же количестве цитратный буфер. Крыс после легкого эфирного наркоза забивали на 3-ий день декапитацией, очищали поджелудочную железу от жировой мембраны, промывали

охлажденным раствором 0.3 М сахарозы в Трис-НСl буфере, рН 7.4, измельчали и гомогенизировали в 9 объемах Трис-сахарозы в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком.

Митохондриальную фракцию мозга выделяли по методу [8] Митохондриальную фракцию поджелудочной железы получали методом дифференциального центрифугирования в Трис-сахарозе по модифицированному методу [13]. Аминокислоты панкреатических ТХУ экстрактов разделяли с помощью высоковольтного электрофореза на бумаге и определяли нингидриновым методом [2]. Глутамин в электрофоретических фракциях определяли микродиффузионным методом [5]. Результаты подвергнуты статической обработке с использованием критерия Стюдента.

Результаты и обсуждение

Исходя из представленности аминокислот семейства глутамина, ферментов их обмена и рецепторов в мозге и поджелудочной железе и участия их в важнейших функциях этих органов нами была изучена утилизация главных аминокислотных транмиттеров в митохондриальной фракции этих органов крыс в норме и через 3 дня после введения химического диабетогена стрпозотоцина. Из представленных в таблице результатов видно, что как в мозге, так и в поджелудочной железе интактных крыс имеется некоторая утилизация глутамата, которая значительно усиливается при наличии в инкубационной среде АТФ или ЩУК, т.е. утилизация обусловлена трансаминированием глутамата со ЩУК. Нами еще в ранних исследованиях [1. 2] было показано, что АТФ в присутствии ионов

магния путем генерации АДФ и ЩУК усиливает усвоение глутамата аспартаттрансаминазой. Пиридоксальфосфат не оказывает достоверного влияния на утилизацию глутамата. Ни в отдельности и ни на фоне ЩУК или АТФ.

Таблица 1

Утилизация глутамата в митохондриальной фракции мозга и панкреаса интактных и стрептозотоциновых крыс

Органы	Мозг		Панкреас	
	Контроль	Стрептозотцин	Контроль	Стрептозотцин
Фикс. контроль	10.2±0.4	10.2±0.9	9.8±0.5	10.5±0.6
Инк. контроль	8.9±0.8	9.5±0.7	8.5±0.4 *	10.5±0.5
ЩУК	7.0±0.6 *	8.7±0.6	6.2±0.7 *	10.0±0.7
АТФ	5.5±0.6 *	6.7±0.9 *	7.5±0.7	10.0±0.5
ПФ	7.9±0.7	8.2±0.6	8.0±0.7	9.8±0.4
ЩУК+ПФ	7.3±0.6	6.2±0.8	7.1±0.8	9.7±0.5
АТФ+ ЩУК	6.4±0.9	6.2±0.7	7.7±0.9	8.3±0.5 *
АТФ+ПФ+ЩУК	6.4±0.3	6.6±0.6	7.5±0.5	7.4±0.5 *

Примечание: Инкубационная смесь содержала в 1 мл 0.5 мл митохондрий в 0.1 М Na- фосфатном буфере, 0.1 мл 0.12 М MgCl₂, 0.1мл (10мкМ) глутамата, об'ем доводился до 1 мл 0.1 М Na- фосфатным буфером. В отдельные пробы добавляли по 5мкМ пиридоксальфосфата (ПФ), АТФ и щавелево-уксусной кислоты (ЩУК). Инкубация 40 мин при 37⁰ С.Реакцию останавливали добавлением 0.5 мл 10% ТХУ.

В митохондриях мозга крыс, подвергнутых действию стрептозотоцина добавка ЩУК в инкубационную среду не оказывает существенного влияния на утилизацию глутамата, однако АТФ вызывает статистически значимый ее прирост. Пиридоксаль-фосфат и АТФ стимулируют утилизацию глутамата и в присутствии ЩУК. В митохондриях поджелудочной железы интактных животных отмечается достоверная утилизация глутамата, усиливаемая в присутствии ЩУК. АТФ и пиридоксальфосфат не влияют на утилизацию глутамата, а в присутствии ЩУК несколько снижают ее эффект. ЩУК не влияет на утилизацию глутамата в митохондриях поджелудочной железы стрептозотоциновых крыс, однако в этом случае АТФ статистически значимо усиливает утилизацию глутамата в присутствии как ЩУК, так и ЩУК и пиридоксальфосфата.

Таким образом, стрептозотин, существенно не влияя на утилизацию глутамата в мозге, заметно модулирует этот процесс в поджелудочной железе.

Примечание: Примечание: Инкубационная смесь содержала в 1 мл 0.5 мл митохондрий в 0.1 М Na- фосфатном буфере, 0.1 мл 0.12 М MgCl₂, 0.1мл (10мкМ) ГАМК, об'ем доводился до 1 мл 0.1 М Na- фосфатным буфером. В отдельные пробы добавляли по 5мкМ пиридоксальфосфата (ПФ), α-кетоглутарата (α-КГ) и (ЩУК).

Инкубация 40 мин при 37⁰ С. Реакцию останавливали добавлением 0.5 мл 10% ТХУ.

Таблица 2

Утилизация ГАМК в митохондриальной фракции мозга и панкреаса интактных и стрептозотоциновых крыс

Органы	Мозг		Панкреас	
	Контроль	Стрептозотоцин	Контроль	Стрептозотоцин
Фикс. контроль	9.7±0.7	10.0±0.8	9.5±0.5	9.8±0.6
Инк. контроль	9.4±0.6	9.7±0.6	9.5±0.5	9.6±0.6
α-КГ	5.8±0.5 *	8.8±0.5	7.2±0.8 *	8.8±0.5
ЩУК	6.5±±0.7 *	8.5±0.6	8.1±0.6 *	9.1±0.6
ПФ	9.0±±0.7	8.6±0.5	9.1±0.5	9.1±0.4
α-КГ+ПФ	5.6±0.6	9.1±0.7	7.0±0.5	9.3±0.5
ЩУК +ПФ	6.4±0.5	8.8±0.4	7.9±0.4	9.2±0.4

Как видно из табл. 2 утилизация ГАМК в митохондриях мозга интактных крыс наблюдается в присутствие кетокислот. Пиридоксальфосфат на утилизацию ГАМК как в отдельности, так и в присутствие ЩУК или α-кетоглутарата не влияет. У стрептозотоциновых крыс статистически значимой утилизации ГАМК

в митохондриях мозга не отмечается. Аналогичная, но менее выраженная картина отмечается в митохондриях поджелудочной железы, что по-видимому связано со специфическим влиянием диabetогена на островковые β -клетки.

Известно, что и в мозге и в поджелудочной железе основным источником глутамата и ГАМК является глутамин, который может генерировать ГАМК в мозге как через глутамат, так и согласно нашим данным путем прямого декарбоксилирования глутамина через ГАМК-амид [3, 14]. Последний избегает генерации нейротоксичного глутамата, вызывающего в повышенных концентрациях апоптоз.

Таким образом, стрептозотоцин подавляет утилизацию глутамата и, в особенности ГАМК, в митохондриях поджелудочной железы и мозга, что может играть определенную роль в эндокринной функции поджелудочной железы. Вместе с тем в присутствии ЦУК и АТФ у инфицированных стрептозотоцином крыс отмечается усвоение глутамата.

Литература

1. Камалян Р.Г., Мовсесян С.Г. Некоторые стороны регуляции обмена глутамата, аспартата и ГАМК в митохондриальной фракции мозговой ткани. *Вопр. биохим. мозга*, Изд. АН АрмССР, 2, С. 40-48. 1966.
2. Камалян Р.Г., Бунятян Г.Х., Мовсесян С.Г. Участие некоторых нуклеотидов и пиридоксальфосфата в превращениях глутамата в митохондриальной фракции мозга. *Вопр. Биохим.мозга*. Изд. АН АрмССР. 21 (5): 16-26. 1968.
3. Камалян Р.Г., Микаелян Е.Р., Варданян А.Г., Камалян М.Г. Влияние пиридоксальфосфата на метаболизм глутамина в субклеточных фракциях мозга крыс. *Нейрохимия*, 16, 3, 248-250, 1999.

4. Камалян Р.Г, Арутюнян А.А, Хачатрян Н.Х., Варданян А.Г., Тароян С.Г. Влияние ГАМК-генерирующих факторов на содержание нейроактивных аминокислот в органах крыс при экспериментальном стрептозотоциновом диабете. Мед. Наука Армении НАН РА, т. LV, N 4, с.32-42, 2015.
5. Силакова А.И., Труш Г.П., Явилякова А. Микрометод определения аммиака и глутамина в тканевых ТХУ экстрактах. Вопр.мед.химии. 5, 538-542. 1962.
6. Adeghate E., Ponery A.S. GABA in the endocrine pancreas: Cellular localization and function in normal and diabetic rats. Tissue cell, 34, 1-6, 2002.
7. Baekkeskov S., Anastoot H. J., Christgua S. et al. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthezing enzyme glutamic acid decarboxylase. Nature, 347. p. 151-156, 1990.
8. Brody F.N., Bain J.A. A mitochondrial preparation from mammalian brain. J. Biol. Chem., 195, p. 685-692, 1952
9. Dong H., Kumar M., Zhang Y., Gyulkhandanyan A. et al. Gamma-aminobutyric acid up- and down regulates insulin secretion from beta cells in concert with changes in glucose concentration. Diabetologia, v.49, p. 697-705, 2006.
10. Fahien L.A., MacDonald M.J. The complex mechanism of glutamate dehydrogenase in insulin secretion. Diabetes, 2011, 60 (10), 2450-2454
11. D.J.Garry, H.D.Coulter , T.J. Mc Intee, J.Y.Wu, R.L. Sorenson. Immunoreactive GABA-T within the pancreatic islets localized in mitochondria in the β -cell. J. Histochem.Cytochem. v.35, p. 831-836,1987.
12. D.J.Garry, R.L.Sorenson, R.P.Elde, B.E. Maley, A. Madsen. Immunohistochemical co-localization of GABA and insulin in beta cells of rat islet. Diabetes. v.35. p. 1090-1095, 1986.
13. Hodarnau A, Dancea C., Barzu O. Isolation of highly purified mitochondria from rat pancreas. The Journal. of Cell Biology. v. 59, p.222-227, 1973.

14. Kamalyan R.G., Vardanyan A.G. GABA and GABA-amide metabolism in the brain. *Neurochemical Journal*, v. 6, N2, p.100-103. 2012.
15. D.L. Kaufman, M.G. Erlander, M. Clare-Salzler, M.A. Atkinson, N.K. Maclaren, A.J. Tobin Glutamate Decarboxylase Autoimmunity in Insulin-dependent Diabetes Mellitus. *J. Clin. Invest.* v.89 (1). P. 283–292. 1992.
16. Szskudelski G. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β -cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.*, 50, 537-546, 2001.
17. Malaisse-Lagae F., Sener A., Garsia-Morales P. et al. The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release. Influence of nonmetabolized analog of leucine on the metabolism of glutamine in pancreatic islets. *J. Biol. Chem.* 257, 3754-3758, 1982.
18. Michalik M., Erecinska M. GABA in pancreatic islets: metabolism and function. *Biochem. Pharmacol.*, vol. 44, N 1, pp. 1-9, 1992.
19. Y. Okada, H. Taniguchi, C. Shimada. High concentration of GABA and high glutamate decarboxylase activity in the rat pancreatic islets and human insulinoma. *Science*. v. 194. P. 620-622, 1976.
20. Sorenson R.L., Garry D.G., Brelje T. C. Structural and functional considerations of GABA in islets of Langerhans. *Diabetes*. v. 40. P. 1365-1374, 1991.
21. Tian J., Chau C., Hales T.G. et al. GABA_A receptors mediate inhibition of T cell responses *J. Neuroimmunol.*, 96, p. 21-28. 1999.
22. Tian J., Kaufman D.L. Antigen-based therapy for the treatment of type 1 diabetes. *Diabetes*. 58, 1939-1946, 2009.
23. Tian J., Dang H., Nguyen An V., Chen Z., Kaufman D.L. Combined therapy with GABA and proinsulin/alum acts synergistically to restore longterm normoglycemia by modulating T-cell autoimmunity and promoting β -cell replication in newly diabetic NOD mice. *Diabetes*, v.63, no.9, 3128-3134, 2014.
24. Wan Y., Wang Q., Prud'homme G.J. GABAergic system in the endocrine pancreas: a new target for diabetes treatment. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.*, 8, p.79-87, 2015.

Механизмы взаимодействия коры мозжечка и медиальной ретикулярной формации

**Терзян Д. О., Маргарян А. В., Григорян М. Л., Манвелян Л.
Р.**

Институт физиологии им. Л. А. Орбели НАН Республики
Армения

Введение

Проведенные на млекопитающих исследования указывают, что медиальная ретикулярная формация (МРФ) получает входы из вестибулярной системы. Морфологическими исследованиями обнаружено наличие волокон, начинающихся в вестибулярном ядре и оканчивающихся в ретикулярной формации (РФ). Орловским и др. [10] показано, что большинство ретикулоспинальных нейронов в различных ретикулярных ядрах ствола мозга отвечали на естественную стимуляцию вестибулярных рецепторов. Известно, что ретикулоспинальные нейроны играют важную роль в медиации вестибулярных влияний на спинальные моторные механизмы у млекопитающих. Выявлено, что ретикулоспинальные нейроны получают коротколатентные возбуждающие влияния с вестибулярных афферентов [11]. РФ является одной из фундаментальных систем мозга и развита у всех позвоночных, а ретикулоспинальный тракт представляет собой наиболее древнюю церебро-спинальную систему. У млекопитающих были обнаружены тормозные мозжечковые влияния на нейроны РФ. Эти влияния опосредуются вполне определеннымиocerebellar-ретикулярными путями [11]. Исследование у низших позвоночных, таких как лягушки, единичны. Существует мнение о сходстве вестибуло-ретикуло-мозжечковых связей лягушки

и более высших позвоночных. Исходя из вышеизложенного, представляется важным исследование вестибуло- и мозжечково-ретикулярных отношений у амфибий.

Материалы и методы

Эксперименты были проведены на 98 взрослых озерных лягушках (*Rana ridibunda*) обоего пола по методике изолированного перфузируемого мозга [3]. Животных наркотизировали раствором MS-222 (0.2г/кг). Вскрывалась грудная клетка и обнажалось сердце. Через его желудочек в дугу аорты вводилась канюля с целью перфузии раствором Рингера для холоднокровных, насыщенным карбогеном и охлажденным до 10°-18°С. С дорсальной стороны вскрывался череп. Электрическое раздражение передней ветви VIII нерва осуществлялось одиночными ударами постоянного тока (0.1-0.2 мс; 0.05-0.4 мА) посредством серебряного всасывающего электрода. Краниотомией обнажался также мозжечок. Под визуальным контролем на поверхность аурикулярной области осторожно прикладывались биполярные шариковые электроды. Для раздражения аурикулярной области коры мозжечка использовались биполярные серебряные шариковые электроды. Применялись те же параметры тока, что и при раздражении передней ветви VIII нерва. С целью внутриклеточного отведения МРФ использовались сточенные стеклянные микроэлектроды, заполненные раствором 2М лимоннокислого калия с сопротивлением 10-20 МΩ. Наилучший эффект отведения потенциалов нейронов МРФ в ответ на раздражение вестибулярного нерва наблюдался, когда электрод вводили в область дна четвертого желудочка на 1.5-2.0 мм каудальнее входа вестибулярного нерва в ствол мозга, на 200-500μм латеральнее средней линии и погружали на глубину 500-1000μм от дорсальной поверхности.

Проводился компьютерный анализ данных. Приведены среднеарифметические стандартные отклонения показателей.

Результаты и осуждение

Внутриклеточная активность была зарегистрирована у 211 нейронов МРФ. Электрическое раздражение вестибулярного нерва в указанных нейронах вызывало химически передаваемый возбуждающий постсинаптический потенциал (ВПСП). У 155 нейронов скрытый период ВПСП составлял в среднем 2.28 ± 0.43 мс (1.46-3.0 мс). Эти ВПСП характеризовались быстрой фазой восхождения в пределах 1.36-4.87 мс (в ср. 3.12 ± 0.89 мс; $n=84$) (рис. 1, а, 1-4, в). Амплитуда описанного ВПСП градуально увеличивалась при увеличении интенсивности раздражения вестибулярного нерва и достигала 0.4-0.53 мВ (в ср. 1.06 ± 0.44 мВ; $n=63$). Дальнейшее увеличение интенсивности стимуляции приводило к возникновению на основе ВПСП потенциалов действия (ПД) со скрытым периодом 1.83-6.73 мс (в ср. 3.92 ± 1.13 мс; $n=56$) (рис. 1, а, 1-4, г). Продолжительность скрытого периода и фазы восхождения испытывали незначительные изменения при различных интенсивностях раздражения вестибулярного нерва.

Морфо-анатомическими исследованиями, проведенными на прудовой лягушке (*Rana esculenta*) выявлено, что нейроны МРФ в изобилии снабжаются вестибулярными волокнами [9].

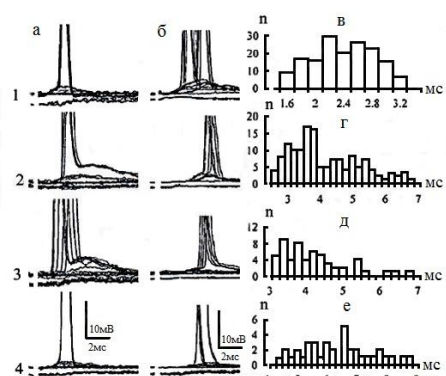


Рис. 1 Синаптическая активация нейронов медиальной ретикулярной формации на раздражение ипсилатерального вестибулярного нерва. а, 1-4 – моносинаптические; б, 1-4 – полисинаптические ВПСП и ПД при различной интенсивности стимуляции VIII

нерва. Нижние кривые (а, 1-4; б, 1-4) экстраклеточные контрольные записи после выхода микроэлектрода из клетки, в и д-гистограммы распределения скрытых периодов моно- и полисинаптических ВПСП нейронов медиальной ретикулярной формации соответственно, г и е - гистограммы распределения моно- и полисинаптических ПД нейронов медиальной ретикулярной формации на раздражение VIII нерва соответственно.

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

Приведенные данные дают основание предположить о возможности моносинаптической активации нейронов МРФ вестибулярными афферентами.

У 56 ретикулоспинальных нейронов в ответ на раздражение вестибулярного нерва были зарегистрированы ВПСП, характеризующиеся большей величиной и нестабильностью скрытых периодов в пределах 3.15-6.82 мс (в ср. 4.13 ± 1.0 мс; $n=56$) в зависимости от интенсивности раздражения (рис. 1, б, 1-4, д). Длительность фазы нарастания колебалась в пределах 1.36-6.34 мс (в ср. 3.22 ± 0.98 мс; $n=20$). Общая длительность зарегистрированных потенциалов составляла 4.98-17.54 мс (в ср. 11.03 ± 2.33 мс; $n=23$). Увеличение интенсивности стимуляции приводило к возрастанию амплитуды ВПСП, которая в среднем равнялась 1.18 ± 0.54 мВ (0.41-2.8 мВ; $n=15$), и к возникновению на их основе ПД со скрытым периодом 4.26-10.31 мс (в ср. 6.43 ± 1.28 ; $n=39$) (рис. 1, б, 1-4, е). Вышеотмеченные характеристики зарегистрированных ВПСП указывают на их полисинаптическое происхождение, в соответствии с данными литературы относительно полисинаптического влияния вестибулярных афферентов на ретикулоспинальные нейроны, опосредуемые через вестибулярный ядерный комплекс [10].

Одинокое раздражение аурикулярной области коры мозжечка вызывало тормозные постсинаптические потенциалы (ТПСП). Лишь

30% идентифицированных нейронов МРФ отвечали на стимуляцию мозжечка. Внутриклеточная активность зарегистрирована в 175 ретикулярных нейронах. Учитывая временные характеристики исследованных ответов, мы условно разделили зарегистрированные ТПСП на две группы: коротко- и длиннолатентные.

Скрытый период 56 нейронов составлял 1.65-3.0 мс (в ср. 2.56 ± 0.33 мс; $n=56$) (рис. 2, а 2, б 2; рис. 3) и не изменялся при различной интенсивности стимуляции. Не изменялось и время нарастания амплитуды до максимума. Фаза восхождения составляла в среднем 3.72 ± 0.93 мс (2.1-6.15 мс; $n=52$). Их амплитуда достигала 0.57-3.3 мВ (в ср. 1.58 ± 0.58 мВ; $n=52$). Общая длительность колебалась в пределах 7.46-22.5 мс (в ср. 11.6 ± 3.16 ; $n=55$) (рис. 2, а 2, б 2; рис. 3). Отмеченные показатели дали основание рассматривать данные ТПСП как моносинаптические.

Известно, что синаптическая задержка в центральной нервной системе амфибий имеет величину порядка 1 мс [8]. В литературе отсутствуют морфологические исследования о проекции аксонов клеток Пуркинье в РФ лягушек, тогда как на млекопитающих морфологически и электрофизиологически показана прямая связь мозжечка с РФ [4]. Это позволяет предположить, что коротколатентные ТПСП генерировались моносинаптически в нейронах РФ, предположительно прямой активацией аксонов клеток Пуркинье, проецирующихся в МРФ, по аналогии с существующей прямой связью клеток Пуркинье с ВЯК [1, 2].

Во вторую группу были включены 119 ретикулярных нейронов, в которых стимуляция аурикулярной области коры мозжечка вызывала ТПСП с более длительным и нестабильным скрытым периодом (рис. 2, в 2, г 2; рис. 3). Они характеризовались четким укорочением скрытых периодов и времени нарастания

гиперполязации ТПСП до максимума при увеличении интенсивности стимуляции.

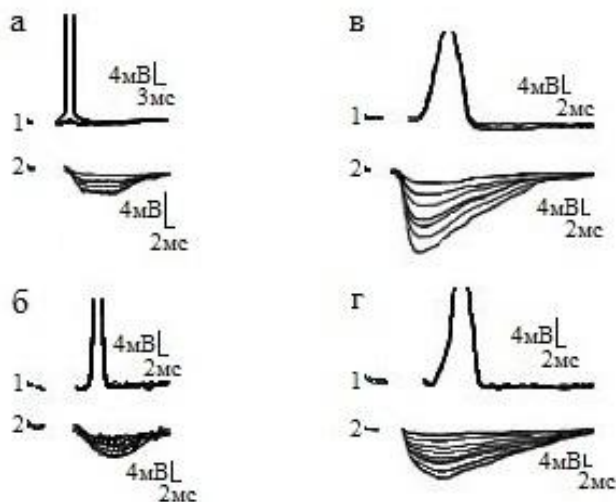


Рис. 2. Постсинаптические потенциалы четырех нейронов медиальной ретикулярной формации на раздражение аурикулярной области мозжечка.

а 2, б 2 – моносинаптические, в 2, г 2 – полисинаптические ТПСП.

а 1, б 1, в 1, г 1 – ВПСП тех же нейронов на раздражение передней ветви вестибулярного нерва с целью идентификации.

Их скрытый период колебался в пределах 3.04-6.0 мс (в ср. 4.2 ± 0.8 мс; $n=119$). Длительность времени нарастания амплитуды до максимума составляла в среднем 5.16 ± 1.24 мс (2.22-8 мс; $n=87$). Амплитуда достигала максимума в среднем 1.8 ± 0.62 мВ (0.63-3.5 мВ; $n=92$). Общая длительность данных ТПСП была в пределах 8.18-27.8 мс (в ср. 15.5 ± 4.6 мс; $n=112$) (рис. 2, в 2, г 2; рис. 3). Вышеотмеченные временные характеристики зарегистрированных ТПСП и их зависимость от интенсивности стимуляции указывают на полисинаптическое происхождение.

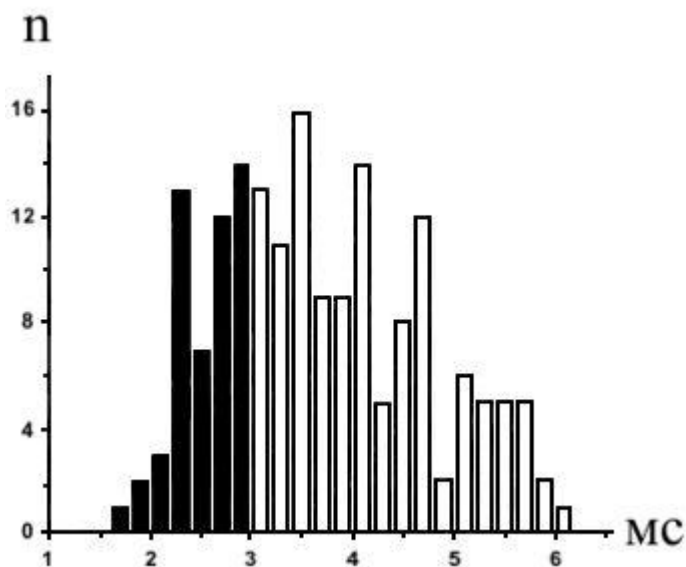


Рис. 3. Гистограмма распределения моно- (черные столбики) и полисинаптических (белые столбики) ТПСП нейронов медиальной ретикулярной формации в ответ на раздражение ипсилатеральной аурикулярной области коры мозжечка. По оси абсцисс – время (мс); по оси ординат – количество исследованных нейронов (n).

Выявлено, что длиннолатентные ТПСП, вызванные слабой стимуляцией поверхности мозжечка постепенно укорачивались по времени при увеличении интенсивности стимуляции, т. е. при пространственной суммации входов параллельных волокон к дендритам клеток Пуркинье [8]. Мы полагаем, что описанные полисинаптические ТПСП возникали не прямой, а косвенной активацией клеток Пуркинье [6, 7] через параллельные волокна, по аналогии с таковыми, зарегистрированными в ВЯК, в ответ на раздражение аурикулярной области коры мозжечка [1, 2].

Имеет ли данный нейрон коротко- или длиннолатентные ТПСП зависит не только от интенсивности стимуляции, но и от локализации раздражающего электрода, поскольку некоторые вестибулярные нейроны отвечают моносинаптически при очень слабой стимуляции, а

другим необходим сильный стимул. Частота появления отмеченных ТПСП снижалась при перемещении раздражающего электрода поближе к средней линии мозжечка [8].

Таким образом, можно предположить о наличии вышеописанного механизма также в отношении мозжечково-ретикулярных взаимоотношений, учитывая зарегистрированные нами ТПСП. Мозжечок активно вовлекается в регуляцию позы и движения самого различного характера, кооперируясь помимо вестибулярной также с ретикулярной системой ствола мозга. Мы полагаем, что вышеотмеченные функции мозжечка амфибий схожи с таковыми млекопитающих.

Литература

1. Манвелян Л. Р., Насоян А. М., Терзян Д. О. О некоторых особенностях влияния коры мозжечка на деятельность вестибулярного ядерного комплекса лягушки. В сб.: Физиологические механизмы регуляции деятельности организма. Межд. юбил. конф., посвящ. 130-летию акад. Л. А. Орбели, изд. "Гитутюн", Ереван, 2012, с. 189-194.
2. Манвелян Л. Р., Насоян А. М., Терзян Д. О. Синаптическая организация вестибулярных афферентных входов в вестибулярный ядерный комплекс лягушки. ДАН Армении, 2013, т. 113, № 2, с. 217-223.
3. Погосян В. И., Фанарджян В. В., Манвелян Л. Р. Микроэлектродное исследование вестибулярных нейронов в изолированном перфузируемом мозгу лягушки *Rana ridibunda*. Журн. эвол. биох и физиол., 1997, т. 5, с. 164-173.
4. Фанарджян В. В., Саркисян В. А. Пространственная организация тормозного контроля активности вестибуло-спинальных нейронов ядра Дейтерса клетками Пуркинье коры передней доли мозжечка. Нейрофизиология, 1979, т. 11, № 1, с. 54- 64.
5. Hillman D. E. Light and electron microscopical study of the relationships

- between the cerebellum and the vestibular organ of the frog. *Exp. Brain Res.*, 1969, v. 9, № 1, p. 1-15.
6. Llinás R., Bloedel J. R., Hillman D. E. Functional Characterization of Neuronal Circuitry of Frog Cerebellar Cortex. *J. Neurophysiol.*, 1969, v. 32, p. 847-870.
 7. Llinás R., Precht W. The Inhibitory Vestibular Efferent System and its Relation to the Cerebellum in the Frog. *Exp. Brain Res.*, 1969, v. 9, № 1, p. 16-29.
 8. Magherini P. C., Giretti M. L., Precht W. Cerebellar Control of Vestibular Neurons of the frog. *Arch.*, 1975, v. 356, p. 99-109.
 9. Matesz C. Central projections of the VIII-th cranial nerve in the frog. *J. Neuroscience.*, 1979, v. 4, № 7, p. 2061-2071.
 10. Orlovsky G. N., Deliagina T. G., Wallen P. Vestibular control of swimming in lamprey. *Brain Res.*, 1992, v. 90, № 3, p. 479-488.
 11. Peterson B.W., Filion M., Fempel L.P., Abzug Ch. Responses of medial reticular neurons to stimulation of the vestibular nerve. *Exp. Brain Res.*, 1975, v. 22, p. 335-350.

Բովանդակություն

Թեզիսներ

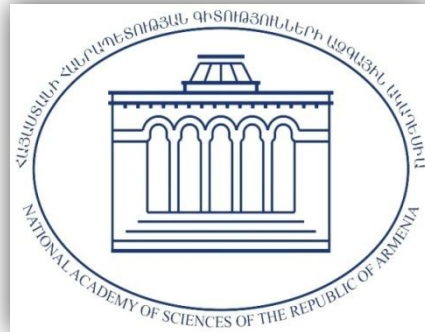
1. Azaryan A.S., Gabrielyan L.S., Panosyan H.H., Trchounian A.H. Effect of growth conditions on total carotenoid production by <i>Haloarcula Japonica</i> A-2 isolated from avan (armenia) subterranean salt deposit-----	11
2. Barkhudaryants I.M., Badalyan R.B., Simonyan A.A., Sakeyan R.D., Margaryan A.S. The effect of prp on the activity of atpase in liver mitochondria of white rats with corazole-induced epileptiform seizures-----	11
3. Danielyan M.H., Khachatryan V.P., Savayan A.A., Nazaryan O.H., Karapetyan K.V., Ghevondyan T.H. Taurine and alcohol: the influence of taurine on the cell structures in the rat brain in condition of alcohol intoxication-----	12
4. Grigoryan L.S., Stepanyan H.A., Paronyan Z. Kh. The effect of hypothalamic proline-rich peptide PRP-1 on fibrinolysis-----	13
5. Gyzalyan M., Harutyunyan K., Hayrapetyan M., Musayelyan R., Khondkaryan L. Immunomodulatory activity of the ethanolic fraction of ziziphora serpyllacea l. Leaves-----	14
6. Hovhannisyan G., Sarukhanyan F., Hunanyan O., Zakaryan H., Barkhudaryan N. Calcineurin activity changes in pathophysiology of colon cancer depending on stage of disease -----	16
7. Israyelyan A. L., Arstamyanyan L.A., Aleqsanyan L.A. Antimicrobial properties of lab isolated from milk of different animals -----	17
8. Karapetyan L.G., Sharoyan S.G., Antonyan A.A., Mardanyan S.S. The citrullination of adenosine deaminase isoforms in synovial fluids at arthritis -----	18
9. Poghosyan H.L., Panosyan H.H., Trchounian A.H. Effect of growth conditions on production and composition of total carotenoids of <i>Thermus Scotoductus</i> K1 isolated from geothermal spring of karvachar -----	20
10. Sahakyan I.K., Tumasyan N.V., Kocharyan N.V., Galoian K.A., Abrahamyan S.S. Effect of thy hypothalamic proline-rich polypeptides (PRP-1) on the viability of mouse Ehrlich Ascites Carcinoma (EAC) cultured cells -----	20
11. Sakeyan H.D., Badalyan R.B., Barkhudaryants I.M., Simonyan A.A., Margaryan A.S. The influence of prp on the activity of atpase in the brain of white rats with corazol-induced epileptiform seizures -----	21

12. Taroyan S.O., Khachatryan H.S., Khachatryan N. KH., Vardanyan A. G., Qamalyan R. G.	
Utilization of glutamate and gaba in the brain and pancreas mitochondria in norm and streptozotocin indust-experemental diabetsr.-----	22
13. Terzyan D.O., Margaryan A.V., Grigoryan M.L., Manvelyan L.R.	
Mechanisms of interaction between the cerebellar cortex and the medial reticular formation -----	23

Հոդվածներ

1. Ազարյան Ա.Ա., Գաբրիելյան Լ.Ա., Փանոսյան Հ.Հ., Թոշունյան Ա.Հ.	
Աճեցման պայմանների ազդեցությունը ավանի (հայաստան) աղի հանքից մեկուսացված <i>Haloarcula Japonica</i> A2 շտամի ընդհանուր կարոտինոիդների արտադրության վրա -----	25
2. Պողոսյան Հ.Լ., Փանոսյան Հ.Հ., Թոշունյան Ա.Հ.	
Աճի պայմանների ազդեցությունը քարվաճառի երկրաջերմային աղբյուրից մեկուսացված <i>Thermus Scotoductus</i> K1 շտամի ընդհանուր կարոտինոիդների արտադրության եվ կազմի վրա -----	34
3. Даниелян М.А., Хачатрян В.П., Саваян А.А., Абраамян С.С., Назарян О.А., Карапетян К.В., Гевондян Т.А.	
Таурин и алкоголь: влияние таурина на клеточные структуры мозга крыс после алкоголизации -----	43
4. Тароян С.К., Хачатрян Р.С., Хачатрян Н.Х., Варданян А.Г., Камалян Р.Г.	
К обмену нейроактивных аминокислот в митохондриях мозга и панкреаса в норме и при экспериментальном стрептозотоциновом диабете -----	57
5. Терзян Д. О., Маргарян А. В., Григорян М. Л., Манвелян Л. Р.	
Механизмы взаимодействия коры мозжечка и медиальной ретикулярной Формации -----	66

Խորին շնորհակալություն մեր հովանավորներին



ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվան
ԿԵՆՏԱՔԻՄԻԱՅԻ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՀՀ Գիտությունների
Ազգային Ակադեմիա



ՀՀ ԳԱԱ Գիտության
Զարգացման
Հիմնադրամ



ՀՀ ԿԳՆ Գիտության
Պետական Կոմիտե



**THE ARMENIAN ASSOCIATION
OF BIOCHEMISTS**

Կենսաքիմիկոսների Հայկական Ասոցիացիա

