



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

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1 (61), 2009

ԷԼԵԿՏՐԱԻՆԴՈՒԿՑՎԱԾ ԱԶԱՏ ՌԱԴԻԿԱԼՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄՈՂԵԼԱՑԻՆ ԵՎ ԲՆԱԿԱՆ ԹԱՂԱՆԹՆԵՐԻ ԼԻՊԻԴՆԵՐԻ ԳԵՐՕՔՍԻԴԱՅԻՆ ՕՔՍԻԴԱՑՄԱՆ ՎՐԱ

Թ.Ե. ՄԵՖԵՐՅԱՆ

Երևանի պետական համալսարան, կենսաֆիզիկայի ամբիոն

Ուսումնասիրվել է էլեկտրաինդուցված ազատ ռադիկալների ազդեցությունը լիպիդային երկշերտ կառույցներ հանդիսացող լիպոսոմների, ինչպես նաև *Escherichia coli* բակտերիաների K12 (վայրի տիպ) շտամի վրա: Բացահայտվել է, որ հետէլեկտրոլիզային ազատ ռադիկալներն ունեն բավական երկար կյանքի տևողություն և ակտիվորեն փոխազդում են լիպիդային երկշերտ կառույցների հետ, առաջացնելով լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացում, որն արտահայտվում է քիմիումինեսցենսման ինտենսիվության մակարդակի և լիպիդների օքսիդացման վերջնական արգասիքի՝ մալոնային երկալդեհիդի կոնցենտրացիայի ավելացմամբ:

*Լիպոսոմ - ազատ ռադիկալներ - էլեկտրաքիմիումինեսցենսում -
Escherichia coli K12*

Исследовано влияние постэлектроиндуцированных свободных радикалов на липидные бислойные мембраны – липосомы, а также на бактерии *Escherichia coli* K12. Выявлено, что постэлектролизные свободные радикалы имеют довольно продолжительное время жизни и активно взаимодействуют с бислойными липидными структурами, вызывая перекисное окисление липидов, которое проявляется повышением интенсивности хемилюминесценции и концентрации конечного продукта перекисного окисления липидов - малонического диальдегида.

*Липосома - свободные радикалы - электрохемилюминесценция -
Escherichia coli K12*

The influence of electro-induced free radicals on lipid bilayer membranes – liposomes as well as on the bacterium *Escherichia coli* K12 is investigated. It is revealed that post-electrolyzed free radicals have a significantly long life time and actively interact to bilayer lipid structures causing lipid peroxidation, which is evidenced by an increase in the intensity of chemiluminescence and the concentration of the end-product of lipid peroxidation- malonic dialdehyde.

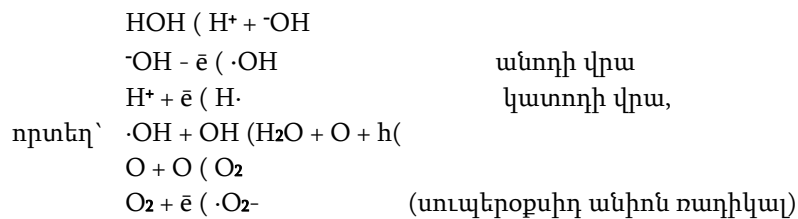
Liposome - free radicals – electrochemiluminescence - Escherichia coli K12

Ներկայումս բժշկության մեջ լայն տարածում են ստացել էլեկտրաբուժական միջոցները: Վերջիններս կիրառվում են կենտրոնական և պերիֆերիկ նյարդային, սրտանոթային, հենաշարժողական, աղեստամոքսային, տեսողական և այլ համակարգերի խանգարումների բուժման ժամանակ [3]:

Չնայած այն հանգամանքին, որ այս մեթոդները բավականին խորապես ուսումնասիրվել են ֆիզիկաքիմիական տեսակետից, այնուամենայնիվ բջջային տարբեր կառույցներում ընթացող որոշ պրոցեսներ դեռևս լիովին բացահայտված չեն՝ մասնավորապես էլեկտրական հոսանքի ազդեցության ժամանակ առաջացող ազատ ռադիկալների փոխազդեցությունը բջջի թաղանթային կառույցների հետ:

Ներկայացվող աշխատանքում դիտարկվել է էլեկտրաինդուկցված ազատ ռադիկալների ազդեցությունը թաղանթային մոդել հանդիսացող լիպոսոմների և որպես մոդելային բջջային համակարգ ընտրված *Escherichia coli* բակտերիաների K12 շտամի վրա:

Հայտնի է, որ էլեկտրոլիզի ժամանակ էլեկտրոլիտում առաջանում են քիմիապես ակտիվ արգասիքներ՝ ազատ ռադիկալներ՝ $\text{HO}\cdot$, $\text{HOO}\cdot$, $\cdot\text{OO}\cdot$, H_2O_2 , $\text{H}\cdot$, որոնցից առավել մեծ ակտիվությամբ օժտված են թթվածնային ակտիվ արգասիքները: Վերջիններիս առաջացման հավանական մեխանիզմը բերվում է ստորև [1]:



Պարզ էլեկտրոլիտիկ համակարգերում, օրինակ KCl -ի ջրային լուծույթում, նույնպես առաջանում են հետէլեկտրոլիզային ազատ ռադիկալներ, որոնց առաջացրած շղթայական ռեակցիաներն ունեն բավական երկար հետէլեկտրոլիզային տևողություն: Վերջինիս հաստատուն ինտենսիվությամբ փոփոխվող տևողությունը կազմում է մոտ 40 ր [7]:

Նյութ և մեթոդ: Լիպոսոմների ստացման համար օգտագործվել է խոշոր եղջերավոր անասունի ուղեղից Մյուլլերի մեթոդով անջատված ընդհանուր ֆոսֆոլիպիդները [9]: Լիպոսոմները ստացվել են 0,1 Մ KCl լուծույթում 0,01 մգ/մլ կոնցենտրացիայով ֆոսֆոլիպիդների կախույթի գերձայնային մշակման եղանակով [4, 10, 6]:

Ազատ ռադիկալների ինդուկցման համար որպես միջավայր վերցվել է 3 մլ 0,1 Մ KCl լուծույթ, քանի որ այն հանդիսանում է բարձր էլեկտրաքիմիամիներսկային վերաբարձրողականություն ունեցող պարզ համակարգ և միաժամանակ հանդիսանում է հյուսվածքներում միջբջջային հեղուկ միջավայրի բաղադրամաս: Ինդուկցումը իրականացվել է օպտիկական բաժակում ընկղմված պլատինե կետային էլեկտրոդների վրա 15 Վ 250 մԱ հաստատուն հոսանքի ներդրմամբ: Էլեկտրոդների միջև հեռավորությունը կազմել է 20 մմ: Կիրառված հոսանքը համադրելի է էլեկտրաբուժական (օրինակ՝ ֆրանկլինիզացման, գալվանիզացման, դեղային էլեկտրոֆորեզի մեթոդները և դրանց բոլոր տարատեսակները) մեթոդներում կիրառվող հոսանքին, որը սովորաբար կազմում է 30-80 Վ 50 մԱ [3]:

Դիտարկվող ազատ ռադիկալային մեխանիզմով ընթացող գործընթացների ուսումնասիրման համար ընտրվել են քիմիամիներսկային (PL) անալիզի և մալոնալդի և երկալդեհիդի սպեկտրոֆոտոմետրիկ որոշման մեթոդները:

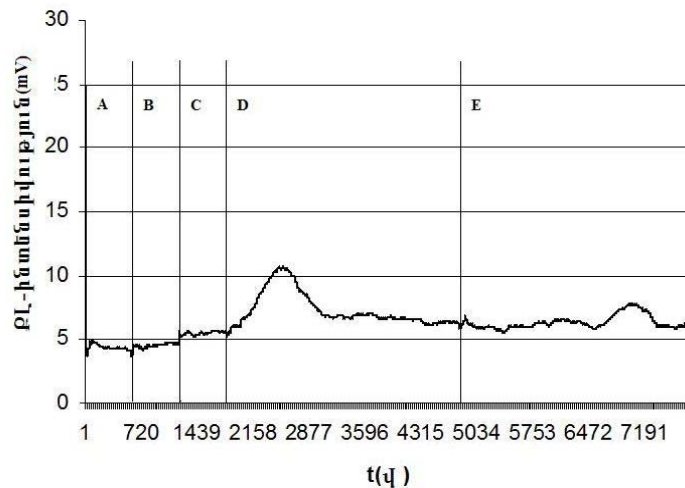
PL անալիզը իրականացվել է քվանտոմետրիկ սարքի միջոցով [1]: Ստացված տվյալների գրանցումը և մշակումը իրականացվել է NI LabVIEW գրաֆիկական ծրագրավորման միջավայրում գործող Archimedes ծրագրով [5, 2]: Գրանցված PL կինետիկական կորերում ստացված արժեքների միջին թվաբանականի շեղումները չեն գերազանցում 5%:

Լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացման վերջնական արգասիքի՝ մալոնային երկալդեհիդի (MDA) քանակական որոշումը իրականացվել է սպեկտրոֆոտոմետրիկ եղանակով՝ 2-թիոբարբիտուրաթթվի թեստի միջոցով, $\text{C}\Phi$ -46-ի օգնությամբ, 532 նմ ալիքի երկարության տակ [6]:

E. coli K12 (վայրի տիպ) շտամը աճեցվել է անաերոբ պեպտոնային միջավայրում (pH 7,2-7,4), 0.2 % գլյուկոզի ավելացմամբ: Բակտերիաները աճեցվել են 18 ժ, 37° ջերմաստիճանում: Բակտերիաների զանգվածը ստացվել է աճման միջավայրը 20 ր 5000 պտ./ր արագությամբ կրկնակի ցենտրիֆուգմամբ, որտեղ միջանկյալ լուծիչ է հանդիսացել թորած ջուրը [8, 11]: Բակտերիաների փորձարարական կախույթը ստացվել է անջատված բակտերիաների զանգվածը 100 անգամ թորած ջրով նոսրացնելու միջոցով: Չափումներն կատարվել են 20° ջերմաստիճանում:

Արդյունքներ և քննարկում: Մինչ այժմ, էլեկտրաքիմիումինեսցենտային բնույթի անալիզներում փորձարկվող նմուշները, որոնք ներմուծվում էին ազատ ռադիկալային միջավայր, նույնպես ենթարկվում էին հոսանքի ազդեցությանը՝ առաջացնելով նոր տիպի ազատ ռադիկալներ և ռադիկալային գործընթացներ, խոչընդոտելով ստացված արդյունքների մեկնաբանմանը:

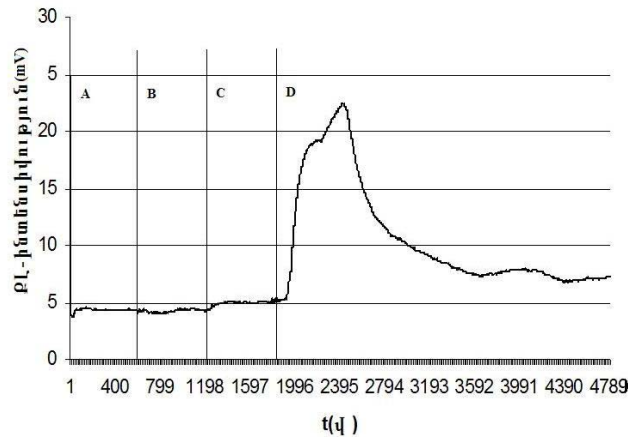
Մեր կողմից էլեկտրաքիմիումինեսցենտոման ստացիոնար փուլում, հոսանքն անջատելուց հետո, գրանցվել է հետէլեկտրաքիմիումինեսցենտոման փաստը: 0,1 Մ KCl համակարգում, ինչպես երևում է նկ.1-ում, հետէլեկտրաքիմիումինեսցենտոման ունի բավական տևական շարունակական ստացիոնար մակարդակ [7]: Վերջինս վկայում է միջավայրում ազատ ռադիկալների առկայության մասին՝ ներդրված լարման բացակայության պայմաններում:



Նկ.1. KCl-ի լուծույթի էլեկտրաքիմիումինեսցենտոմը և հետէլեկտրաքիմիումինեսցենտոմը.

- A. Սարքի ներքին ֆոն,
- B. Սարքի բաց ֆոն (սարքի ներքին ֆոնը և խցիկի ու օպտիկական բաժակի լյումինեսցենտոմը միասին),
- C. KCl-ի լուծույթի սպոնտան ՔԼ,
- D. KCl-ի լուծույթի էլեկտրաքիմիումինեսցենտոմը,
- E. KCl-ի լուծույթի հետ էլեկտրաքիմիումինեսցենտոմը:

Հաշվի առնելով այս հանգամանքը հաջորդ շարք փորձերում դիտարկվել է հետէլեկտրոլիզային ազատ ռադիկալների ազդեցությունը լիպոսոմների վրա: Հետէլեկտրոլիզային լուծույթի 0,5 մլ-ի ավելացումը 3 մլ լիպոսոմային կախույթի վրա առաջ է բերում ՔԼ ինտենսիվության կտրուկ բռնկումային աճ մինչև որոշակի մակարդակ, ապա կինետիկորեն մարում մինչև լիպոսոմային կախույթի սպոնտան ՔԼ մակարդակից բավականին բարձր ստացիոնար փուլ (նկ. 2, D):



Նկ. 2. Լիպոսոմային կախույթի ՔԼ-ն կինետիկան
Էլեկտրահաղորդական

ազատ ռադիկալների ազդեցության ժամանակ.

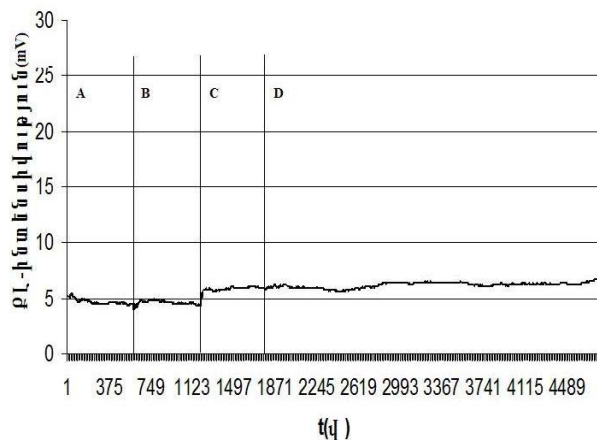
A. Սարքի ներքին ֆոն,

B. Սարքի բաց ֆոն,

C. Լիպոսոմային կախույթի սպոնտան ՔԼ,

D. Լիպոսոմային կախույթի ՔԼ-ն Էլեկտրահաղորդական ազատ
ռադիկալների ազդեցության ժամանակ:

Ստուգիչ փորձերում, երբ 3 մլ լիպոսոմային կախույթի վրա ավելացվել է
0,5 մլ 0,1 Մ KCl լուծույթ, գերծ նախնական ներգործությունից, ՔԼ ինտենսի-
վության որևէ նկատելի փոփոխություն չի գրանցվել (նկ. 3):



Նկ. 3. Լիպոսոմային կախույթի ՔԼ-ն KCl լուծույթի ավելացումից հետո.

A. Սարքի ներքին ֆոն,

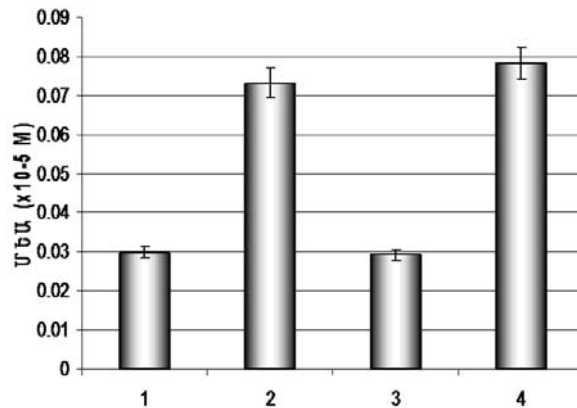
B. Սարքի բաց ֆոն,

C. Լիպոսոմային կախույթի սպոնտան ՔԼ,

D. Լիպոսոմային կախույթի ՔԼ-ն KCl լուծույթի ավելացումից հետո:

Ինչպես հայտնի է, լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացման գնահատ-
ման ուղղակի եղանակներից է ՄԵԱ-ի որոշումը 2-թիոբարբիտուրաթթվի
միջոցով [1]: Ի լրացում ՔԼ անալիզի մեթոդին կատարվել է
Էլեկտրահաղորդական ազատ ռադիկալների ազդեցությամբ պայմանավորված
ՄԵԱ-ի քանակական փոփոխության գնահատում լիպոսոմային կախույթում:

Չափումները ցույց տվեցին, որ էլեկտրահնդուկցված ազատ ռադիկալների ազդեցության արդյունքում լիպոսոմային կախություն ՄԵԱ-ի քանակը գրեթե 160%-ով ավելացել է (նկ. 4. 1, 2):



Նկ. 4. ՄԵԱ-ի քանակական փոփոխությունը լիպոսոմային կախություն և *E. coli* K12 բակտերիաների կախություն.

1. ՄԵԱ-ի քանակը լիպոսոմային կախություն,
2. ՄԵԱ-ի քանակը լիպոսոմային կախություն էլեկտրահնդուկցված ազատ ռադիկալների ազդեցությունից հետո,
3. ՄԵԱ-ի քանակը *E. coli* K12 բակտերիաների կախություն,
4. ՄԵԱ-ի քանակը *E. coli* K12 բակտերիաների կախություն էլեկտրահնդուկցված ազատ ռադիկալների ազդեցությունից հետո:

Լիպոսոմային կախություն գրանցված ՔԼ ինտենսիվության և ՄԵԱ-ի քանակական աճը վկայում է այն մասին, որ հետէլեկտրոլիզային ազատ ռադիկալները փոխազդում են լիպոսոմներում լիպիդային երկշերտի հետ, առաջ բերելով ազատ ռադիկալային շղթայական մեխանիզմով ընթացող լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացում:

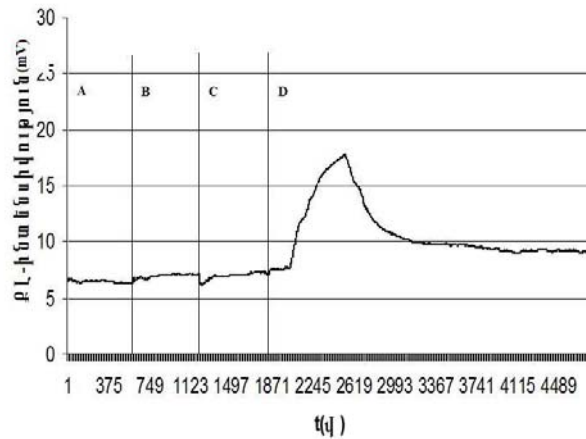
Պարզելու համար, թե արդյոք ստացված արդյունքները համադրելի են նատիվ բջջային լիպիդային կառույցների համար, փորձերը կրկնվեցին, որպես էլեկտրահնդուկցված ազատ ռադիկալների թիրախ ընտրելով *E. coli* K12 բակտերիաները:

Ինչպես երևում է նկ.5-ում, 3 մլ բակտերիաների կախությի վրա հետ էլեկտրոլիզային լուծույթի 0,5 մլ-ի ավելացումը առաջ է բերում ՔԼ ինտենսիվության կտրուկ բռնկումային աճ հետագա մարմամբ: Վերջնական փուլում ՔԼ ինտենսիվությունը անցնում է, բակտերիաների կախությի սպոնտան ՔԼ մակարդակից բավականին բարձր ստացիոնար մակարդակ (նկ. 5, D):

Ինչպես լիպոսոմների կախություն, այնպես էլ բակտերիալ կախություն, հետէլեկտրոլիզային լուծույթի 0,5 մլ ավելացումը առաջ է բերում ՄԵԱ-ի քանակի զգալի աճ 160% (նկ. 4. 3,4):

Այսպիսով, կարելի է ենթադրել, որ էլեկտրաբուժման ժամանակ էլեկտրական ազդակի ներգործման մեխանիզմներից է հյուսվածքներում ազատ ռադիկալների ինդուկցումը և վերջիններիս միջոցով բջջի լիպիդային կառույցների գերօքսիդային օքսիդացումը, որը շարունակվում է նաև ազդակի ներգործությունից հետո:

Ստացված արդյունքները վկայում են այն մասին, որ հետէլեկտրոլիզային ազատ ռադիկալները ունեն կյանքի բավական երկար տևողություն և փոխազդում են բջջի լիպիդային կառույցների հետ, առաջ բերելով լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացում:



Նկ. 5. *E. coli* K12 բակտերիաների կախույթի ՔԼ-ն կինետիկան էլեկտրա-
ինդուկցված ազատ ռադիկալների ազդեցության ժամանակ.
A. Սարքի ներքին ֆոն, B. Սարքի բաց ֆոն,
C. *E. coli* K12 բակտերիաների կախույթի սպոնտան ՔԼ,
D. *E. coli* K12 բակտերիաների կախույթի ՔԼ-ն էլեկտրա-
ինդուկցված ազատ ռադիկալների ազդեցության ժամանակ:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Ջաքարյան Ա. Ե., Ներկարարյան Ա. Վ., Պողոսյան Գ. Հ., Այվազյան Ն. Մ.* Ազատ ռա-
դիկալային գործընթացների և թաղանթային կառույցների կենսաաֆիզիկա: Երևան,
Նորք գրատուն, 2003.
2. *Թոչումյան Ա., Բաղդասարյան Կ., Փոլադյան Ա., Կենսաբանական թաղանթների կեն-
սաֆիզիկա և կենսաէներգետիկա:* Լաբորատոր աշխատանքների ձեռնարկ: Երևան,
Կրթական բարեփոխումների կենտրոն, 2003.
3. *Боголюбов Б.М., Пономаренко Г.Н.* Общая физиотерапия, С-Петербург,
СПИ, 1998.
4. *Кагава Я.* Биомембраны. М., Высш. шк., 1985.
5. *Пименова М.Н., Гречушкина Н.Н, Азова Л.Г., Семенова Е.В., Мыльникова
С.И.,* Руководство к практическим занятиям по микробиологии (под. ред.
Н.С. Егорова), М., Издательство Московского университета, 1983.
6. *Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г.* Современные методы в биохимии (под.
ред. Ореховича В. Н.), М., Медицина, 1977.
7. *Huang C.,* Biochemistry, 8, 344, 1969.
8. *Muller P., Rudin D., Tien H., Wescott W.,* J. Phys. Chem., 67, 534, 1963.
9. *Zakharyan A. E., Seferyan T. Ye., Zakharyan N. A., Toonyan Y. M., Trchounyan
A. H.,* Scientific-Medical Journal of INPH of Armenia, N 2, 87, 2007.
10. *Zakharyan A. E., Seferyan T. Ye.* “Influence of Post Electro-Induced Free
Radicals on Chemiluminescence of Liposomes” The Eighth International
Conference on Systems Biology 1-6 October, 2007, Long Beach , CA USA.
11. *Zakharian A.Ye., Elbakyan V.L., Ayvazian N.M., Pogosyan G.H., Zakharian
N.A., Sefe-ryan T.Ye.* “Basis of chemiluminescence analysis and program
equipment LabVIEW for automatic registration and mathematical elaboration
of datas” Educational, scientific and engineering additions in LabVIEW
surroundings and National Instruments technologies – International scientific-
practical conference: Red. RUFN, 429p. 17-18 November, Moscow, 2006.

Ստացվել է 15.01.2009