



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, հավելված 1 (66), 2014

***Heracleum sosnovskyi* Manden ԲՈՒՅՍԻ ՖՈՏՈՍԵՆՍԻԲԻԼԻԶԱՑՆՈՂ ԱՂԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԹԱՂԱՆԹԱՅԻՆ ԼԻՊԻԴՆԵՐԻ ԳԵՐՕՔՍԻԴԱՅԻՆ ՕՔՍԻԴԱՑՄԱՆ ՎՐԱ**

Թ. Ե. ՍԵՖԵՐՅԱՆ

Ա. Ի. Ալիխանյանի անվ. ազգային գիտական լաբորատորիա (Երևանի ֆիզիկայի ինստիտուտ)
ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտ
seferyant@yahoo.com

Ուսումնասիրվել է Սոսնովսկու բալդոդան (*Heracleum sosnovskyi* Manden) բույսի հյութի ֆոտոինդուցված ազատ ռադիկալների ազդեցությունը լիպիդային երկշերտ կառույցներ հանդիսացող լիպոսոմների, ինչպես նաև *Escherichia coli* բակտերիաների K12 (վայրի տիպ) շտամի վրա: Բացահայտվել է, որ *H. sosnovskyi* բույսի հյութի առկաությունը միջավայրում անդրմանուշակագույն ճառագայթներով ֆոտոինդուցման արդյունքում առաջ է բերում ինտենսիվ ազատ ռադիկալային շղթայական մեխանիզմով ընթացող թաղանթային կառույցների լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացում, որը արտահայտվում է քիմիլումինեսցենսման ինտենսիվության մակարդակի և լիպիդների օքսիդացման վերջնական արգասիքի՝ մալոնային երկալդեհիդի կոնցենտրացիայի ավելացմամբ:

Լիպոսոմ - ազատ ռադիկալներ - ֆոտոսենսիբիլիզացում - քիմիլումինեսցենսում - Սոսնովսկու բալդոդան

Исследовано влияние фотоиндуцированных свободных радикалов сока борщевика Сосновского (*Heracleum sosnovskyi* Manden) на липидные мембраны – липосомы, а также на бактерии *Escherichia coli* K12. Выявлено, что присутствие в среде сока борщевика Сосновского при фотоиндуцировании ультрафиолетовыми лучами приводит к интенсивному цепному свободно-радикальному перекисному окислению липидов мембранных структур, которое проявляется повышением интенсивности хемилюминесценции и концентрации конечного продукта перекисного окисления липидов - малонового диальдегида.

Липосома - свободные радикалы - фотосенсибилизация - хемилюминесценция - Борщевик Сосновского

The influence of photoinduced free radicals of Sosnowsky's Hogweed (*Heracleum sosnovskyi* Manden) sap on lipid bilayer membranes – liposomes, as well as on the bacterium *Escherichia coli* K12 is investigated. It has been discovered that the presence of sap of *H. sosnovskyi* in medium at the ultraviolet irradiation leads to the intensive free radical chain peroxidation of the lipids of bilayer structures, 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 - chemiluminescence - fotosensitizing - Sosnowsky's Hogweed

Ներկայումս բժշկության մեջ լայն տարածում են գտել ֆոտոդինամիկ թերապիայի մեթոդները, որոնք հիմնված են ֆոտոսենսիբիլիզացնող նյութեր պարունակող տարբեր դեղամիջոցների վրա [7]: Ֆոտոդինամիկ թերապիայում կիրառվող ֆոտոսենսիբիլիզացնող նյութերի մեծ մասը հիմնականում էլեկտրամագնիսական սպեկտրի տեսանելի տիրույթում արտահայտված ֆոտոսենսիբիլիզացնող հատկությամբ միացություններ են: Առկա են նաև ֆոտոսենսիբիլիզացնող հատկությամբ միացություններ, որոնք գործում են անդրմանուշակագույն տիրույթի ալիքների ազդեցության դեպքում: Այս նյութերի մի զգալի մասը բավական մեծ քանակներով առկա է տարբեր բուսատեսակներում: Այդ շարքին է պատկանում Սասնովսկու բալդրդանը (*Heracleum sosnovskyi* Manden), որը պարունակում է մեծ քանակությամբ ֆուրանոկումարիններ, մասնավորապես կասնոտոքսին, բեռզապտեն, ամբելիֆերոն, անգելիցին և սֆոնդին [3, 6]: *H. sosnovskyi* բույսը, ունենալով բավական մեծ հարմարվողականություն, շրջակա միջավայրում ներկայումս ունի լայն տարածվածություն [8]: Պարունակելով մեծ քանակով ֆուրանոկումարիններ *H. sosnovskyi* բույսը ունի ֆոտոտոքսիկ հատկություն: Այս բույսի հյուսվածքը ընկնելով կաթնասունների մաշկի վրա արևի լույսի ազդեցությամբ առաջ է բերում 1-3րդ աստիճանի այրվածքներ [2]: Տոքսիկ էֆեկտներ առաջանում են նաև սննդում այս բույսից մեծ քանակությամբ թարմ վիճակում օգտագործելիս: Այրվածքների առաջացման մեխանիզմի հիմքում ընկած է այն հանգամանքը, որ ֆուրանոկումարինները անդրմանուշակագույն ճառագայթման դեպքում առաջացնում են սինգլետ թթվածին [12], որն իր հերթին առաջ է բերում ազատ ռադիկալային բնույթի բազմաթիվ պրոցեսներ: Ելնելով վերը բերվածից, աշխատանքում ուսումնասիրվել է բջջի կենսագործունեության համար առանձնակի կարևոր նշանակություն ունեցող թաղանթային կառույցներում ընթացող ազատ ռադիկալային գերօքսիդային օքսիդացման պրոցեսների վրա *H. sosnovskyi* բույսի ֆոտոսենսիբիլիզացնող ազդեցությունը:

Նյութ և մեթոդ:

Գիտավործերում օգտագործվել են ՀՀ Արարատի մարզի "Խոսրովի անտառ" արգելոցի տարածքում ազատ աճող *H. sosnovskyi* բույսի ցողունային հատվածները: Բույսի հյուսվածքն ընդհանրապես ստացվել է թարմ բույսի ցողունի 1 սմ երկարությամբ կտրատված հատվածներից, սառը (~4 °C) պայմաններում, մամլման միջոցով: Լիպոսոմների ստացման համար օգտագործվել է նախատեսված լիպիդային խառնուրդ Sigma-Aldrich L 4395: Լիպոսոմները ստացվել են 0,1Մ NaCl լուծույթում 0,01 մգ/մլ կոնցենտրացիայով ֆոսֆոլիպիդների կախույթի գերծայնային մշակման եղանակով [9, 10]:

Դիտարկվող ազատ ռադիկալային մեխանիզմով ընթացող գործընթացների ուսումնասիրման համար ընտրվել է քիմյումինեսցենսային (ՔԼ) անալիզի և մալոնային երկալդեհիդի (ՄԵԱ) սպեկտրաֆոտոմետրիկ որոշման մեթոդները:

ՔԼ անալիզը կատարվել է H9319-02 (Hamamatsu-Japan) քվանտոմետրիկ սարքի միջոցով, իմպուլսային ռեժիմում [11]: ՔԼ գրանցումների ժամանակ ֆոտոբազմապատկիչին ներդրված լարումը կազմել է 900 Վ, իսկ ինտեգրացման ժամանակը՝ 1 վ: Նմուշների ճառագայթահարման համար որպես անդրմանուշակագույն ճառագայթման աղբյուր օգտագործվել է DPT-125 տիպի լամպ, որի առաքման տիրույթը կազմում է 230-400 նմ: Նմուշների ճառագայթահարումը կատարվել է կյուվետում, որտեղ ճառագայթահարվող նյութի շերտն ունեցել է 5 մմ հաստություն, իսկ մակերեսը գտնվել է լույսի աղբյուրից 100 մմ հեռավորության վրա: ՔԼ ինտենսիվության գրանցումն իրականացվել է օպտիկական բաժակում, որում փորձարկվող հեղուկի ծավալը կազմել է 3 մլ, իսկ ավելացվող նմուշների ծավալը եղել է 0,25 մլ: ՔԼ ինտենսիվության գրանցումները կատարվել են ճառագայթահարման ավարտից 5 վ անց: ՔԼ ինտենսիվությունների գնահատման համար վերցվել են ՔԼ լուսագումարի միջին արժեքները 60 վ գրանցման համար:

Լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացման վերջնական արգասիքի՝ ՄԵԱ քանակական որոշումը կատարվել է սպեկտրաֆոտոմետրիկ եղանակով՝ 2-թիոբարբիտուրաթթվի թեստի միջոցով, Specord M-40 սպեկտրաֆոտոմետրի օգնությամբ, 532 նմ ալիքի երկարության տակ [5]:

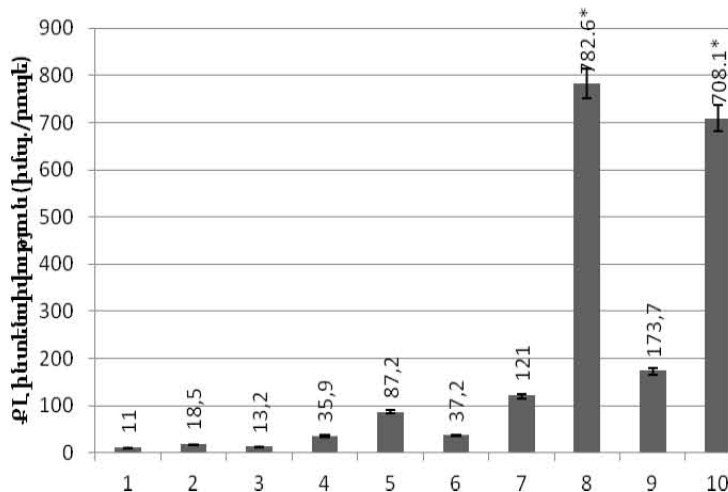
E. coli K12 (վայրի տիպ) շտամը աճեցվել է անաերոբ պեպտոնային միջավայրում (pH 7,2-7,4), 0,2 %-անոց գլյուկոզի ավելացմամբ: Բակտերիաները աճեցվել են 18 ժ, 370 °C ջերմաստիճանում: Բակտերիաների զանգվածը ստացվել է աճման միջավայրը 20 րոպե 5000 պտ./րոպե արագությամբ կրկնակի ցնտրիֆուգմամբ, որտեղ միջանկյալ լուծիչ է հանդիսացել թորած ջուրը [1, 4]: Բակտերիաների փորձարարական կախույթը ստացվել է անջատված բակտերիալ պրեցիպիտատի 100 անգամ նոսրացմամբ (0,1Մ NaCl): Չափումներն

իրականացվել են 20 °C ջերմաստիճանում: Գրանցված ԶԼ արժեքների միջին թվաքանակային շեղումները չեն գերազանցում 5%-ը: Ստացված արդյունքները ենթարկվել են ստատիստիկ վերլուծության և գնահատվել ըստ Ստյուդենտի t-թեստի: Արդյունքները համարվել են հավաստի * = p<0.05 արժեքի դեպքում:

Արդյունքներ և քննարկում:

H. sosnovskyi բույսի ֆոտոսենսիթիլիզացնող հատկության ուսումնասիրման համար որպես թաղանթային մոդելային համակարգ մեր կողմից ընտրվել են լիպոսոմները, որոնց հաճախ դիտարկում են որպես բջժի լիպիդային երկշերտ թաղանթների պարզեցված տարբերակ: Իսկ բնական թաղանթային համակարգերի վրա *H. sosnovskyi* բույսի ֆոտոսենսիթիլիզացնող հատկության ուսումնասիրման համար օգտագործվել են *E. coli* K12 բակտերիաները:

Պարզելու համար ԶԼ ինտենսիվության մեջ փորձարկվող նյութերի սպոնտան ԶԼ մասնաբաժինը, սկզբում չափվել են վերջիններիս սպոնտան ԶԼ արժեքները: Բուսամզվածքի, լիպոսոմների կախույթի և բակտերիալ կախույթի սպոնտան ԶԼ արժեքները բերված են Նկ.1-ում: Չափվել են նաև փորձարկվող նյութերի միմյանց հետ հավանական փոխազդման սպոնտան ԶԼ արժեքները ֆոտոինդուցված ԶԼ (ՖԶԼ) ինտենսիվության մեջ դրանց մասնաբաժինը գնահատելու համար: 3 մլ/0,25 մլ համապատասխան ծավալների դեպքում լիպոսոմային կախույթի և բակտերիալ կախույթի հավանական սպոնտան ԶԼ արժեքները բուսամզվածքի ավելացմամբ բերված են Նկ. 1-ում: Գնահատվել է նաև ՖԶԼ ինտենսիվության մեջ փորձարկվող նյութերի սեփական ՖԶԼ մասնաբաժինը:



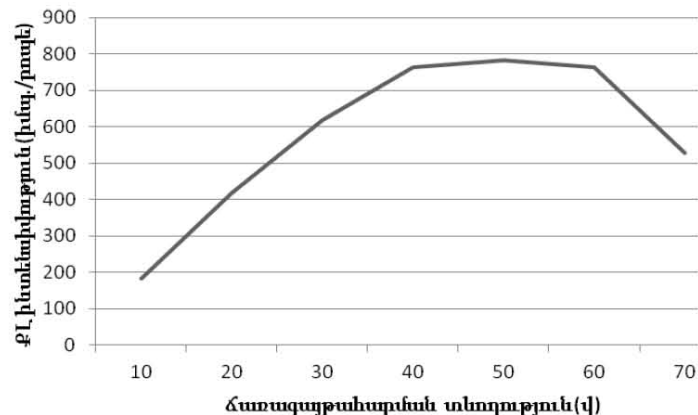
Նկ.1. *H. Sosnovskyi* բույսի հյուսվածքի ազդեցությունը լիպոսոմների և բակտերիաների ՖԶԼ-ն վրա:

1. Բուսամզվածքի ԶԼ (3 մլ 0,1M NaCl + 0,25 մլ հյուսվածք), 2. Լիպոսոմային կախույթի ԶԼ, 3. Բակտերիաների կախույթի ԶԼ, 4. Բուսամզվածքի ՖԶԼ (3 մլ 0,1M NaCl + 0,25 մլ հյուսվածք), 5. Լիպոսոմային կախույթի ՖԶԼ, 6. Բակտերիաների կախույթի ՖԶԼ, 7. Լիպոսոմային կախույթի և նրան ավելացված բուսամզվածքի ԶԼ, 8. Լիպոսոմային կախույթի և նրան ավելացված բուսամզվածքի ՖԶԼ, 9. Բակտերիաների կախույթի և նրան ավելացված բուսամզվածքի ԶԼ, 10. Բակտերիաների կախույթի և նրան ավելացված բուսամզվածքի ՖԶԼ:

Ֆոտոինդուցման ժամանակը բոլոր տարբերակներում եղել է հաստատուն և կազմել է մոտ 50 վ: Վերջինս որոշվել է ուղղորդող փորձերի միջոցով որպես բուսամզվածքի ավելացմամբ լիպոսոմային կախույթի ՖԶԼ մաքսիմալ ինտենսիվություն ապահովող մինիմալ ժամանակային արժեք (Նկ. 2):

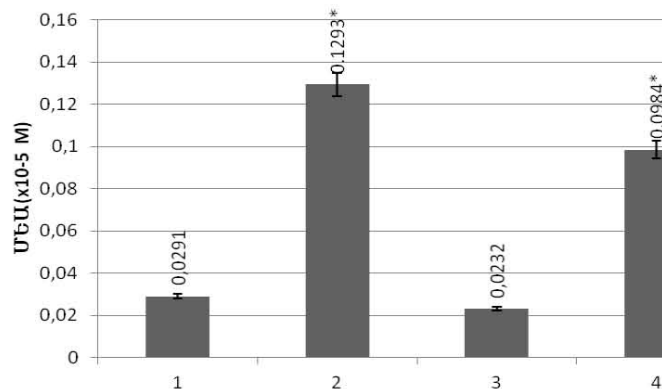
Գրանցված ԶԼ ինտենսիվության արժեքները համեմատելով միմյանց հետ կարելի է արձանագրել, որ բուսամզվածքի ավելացմամբ լիպոսոմային կախույթի ՖԶԼ ինտենսիվությունը ստուգիչ տարբերակների համեմատ ունի ակնհայտ բարձր ցուցանիշ մոտ 546 % (Նկ.2): Նմանատիպ բաժր արժեք է գրանցվում նաև բուսամզվածքի ավելացմամբ բակտերիաների կախույթի ՖԶԼ ինտենսիվության համար մոտ 307 % (Նկ.2):

Ինչպես հայտնի է, լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացման գնահատման ուղղակի եղանակներից է ՄԵԱ-ի որոշումը 2-թիոբարբիտուրաթթվի միջոցով [1, 4]: Ի լրացում ԶԼ անալիզի մեթոդին կատարվել է բուսամզվածքի առկայությամբ ֆոտոինդուկցված ազատ ռադիկալների ազդեցությամբ պայմանավորված ՄԵԱ-ի քանակական փոփոխության գնահատում լիպոսոմային և բակտերիալ կախույթներում:



Նկ. 2. *H. sosnovskyi* բույսի հյուսի ալելացմամբ լիպոսոմային կախույթի ՖԶԼ ինտենսիվության կախվածությունը ֆոտոինդուկցման տևողությունից:

Չափումները ցույց տվեցին, որ բուսամզվածքի առկայության դեպքում ճառագայթահարումից հետո լիպոսոմային և բակտերիալ կախույթներում ՄԵԱ-ի քանակը ավելանում է համապատասխանաբար 344 % և 324 %-ով, ի համեմատ առանց բուսամզվածքի ավելացմամբ ստուգիչ տարբերակների (Նկ. 3):



Նկ. 3. ՄԵԱ-ի քանակական ցուցանիշները լիպոսոմների և բակտերիաների կախույթներում նորմայում, ճառագայթահարումից հետո և *H. sosnovskyi* բույսի հյուսի առկայությամբ ճառագայթահարումից հետո: 1. ՄԵԱ-ի քանակը լիպոսոմային կախույթում: 2. ՄԵԱ-ի քանակը լիպոսոմային կախույթում բուսամզվածքի ավելացումից և ճառագայթահարումից հետո: 3. ՄԵԱ-ի քանակը բակտերիաների կախույթում: 4. ՄԵԱ-ի քանակը բակտերիաների կախույթում բուսամզվածքի ավելացումից և ճառագայթահարումից հետո:

Գրանցված ԶԼ ինտենսիվության և ՄԵԱ-ի քանակական աճը վկայում է այն մասին, որ բուսամզվածքի ֆուրանոսկոմարինների ֆոտոինդուկցման արդյունքում առաջացած ազատ ռադիկալները փոխազդում են լիպոսոմներում լիպիդային երկշերտի հետ, առաջ բերելով ազատ ռադիկալային շղթայական մեխանիզմով ընթացող լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացում:

Ընդհանրացնելով ստացված արդյունքները, կարելի է եզրակացնել, որ բուսամզվածքից առաջացող ֆոտոդինամիկ այրվածքների հիմքում ընկած է հյուսիս բաղադրության մեջ առկա ֆուրանոկումարիների ֆոտոդինամիկական արդյունքում առաջացող ազատ ռադիկալների կողմից բջժի թաղանթային կառույցների լիպիդների շղթայական մեխանիզմով ընթացող գերօքսիդային օքսիդացումը, որը շարունակվում է նաև անդրմանուշակագույն ճառագայթների ներգործությունից հետո: Վերը բերված տվյալները կարող են օգտակար լինել *H. sosnovskyi* բույսի հիմքի վրա պատրաստվող դեղամիջոցների մշակման, ինչպես նաև բույսի հետ շփումից առաջացած այրվածքների բուժման պրոցեսում:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Թոքունյան Ա., Բաղդասյան Կ., Փոլադյան Ա.* Կենսաբանական թաղանթների կենսաֆիզիկա և կենսաէներգետիկա: Լաբորատոր աշխատանքների ձեռնարկ: Երևան, Կրթական քարտեզի հրատարակչության կենտրոն, 2003.
2. *Далькэ И.В., Чадин И.Ф.* Методические рекомендации по борьбе с неконтролируемым распространением растений борщевика Сосновского. Республика Коми, Сыктывкар, 2008.
3. *Мурадян А.А., Априкян С.В.* Кумариновые производные видов *Heracleum L.* из флоры Армении - *H. sosnovskyi* Mand. *H. Trachyloma* Fish. Et Mey., // Биол. ж. Ар., 29 (9), 1976.
4. *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.
5. *Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г.* Современные методы в биохимии (под. Ред. Ореховича В. Н.), М., Медицина, 1977.
6. *Юрлова Л.Ю., Черняк Д.М., Кутюкова О.П.* Фурукумарины *Heracleum sosnovskyi* и *Heracleum moellendorffii*, // Тихоокеанский медицинский журнал, 2, с. 91-93, 2013.
7. *Alison R.R., Downie G.H., Cuenca R., Hu X., Childs C.Jh., Sibeta C.H.* Photosensitizers in clinical PTD, // J. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, Elsevier, 1, p 27-42, 2014.
8. *Jakubowicz O., Żaba C., Nowak G., Jarmuda S., Żaba R., Marcinkowski J.T.* *Heracleum sosnovskyi* Manden. // J. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 19, 2, p. 327-328, 2012.
9. *Medda S., Das N., Mahato S.B., Mahadevan P.R., Basu M.K.* Glycoside-bearing liposomal delivery systems against macrophage-associated disorders involving *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis*.// Indian J. Biochemist and Biophysics, 32, 3, p. 147-151, 1995.
10. *Mueller P., Rudin D.O., Tien H.T., Wescott W.C.* Methods for the Formation of Single Bimolecular Lipid Membrane in Aqueous Solution. // J. Phys. Chem, 67, p.534-535, 1963.
11. *Seferyan T.Ye., Mamikonyan V.Kh., Hovhannisyan A.H., Elbakyan V.L.* "Automatised chemiluminometric equipment for biomedical and chemical analyses" The collection of articles of IV International Scientific and Practical Conference "High-tech, basic and applied research in physiology and medicine", V 2, -138p., November 15-16, 2012, St. Petersburg, Russia.
12. *Wainwright M.* Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). // J. JAC, 42, p. 13-28, 1998.