

ՀՏԴ՝ 577.1

# ԱՄՈՆԻԱԿՈՎ ԶՐԱԾՆԻ ԳԵՐՕՔՍԻԴԻ ՃԵՂՔՄԱՆ ՀԵՏԵՎԱՆՔՈՎ ԳՈՅԱՑԱԾ ՍՈՒՊԵՐՕՔՍԻԴ ՌԱԴԻԿԱԼՆԵՐԻ ՈՐՈՇՄԱՆ ԿԻՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ՄԵԹՈՂԸ. ԴՐԱ ՆՇԱՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆԸ ԲԺՇԿԱԿԱՆ ԲՆԱԳԱՎԱՌՈՒՄ

Սիմոնյան Ռ.Մ.<sup>1</sup>, Ֆեսչյան Ս.Ս.<sup>2</sup>, Ենգիբարյան Ա.Ա.<sup>2</sup>

ՀՀ ԳԱԱ Բուսաբանության և կենսաբանության գիտահետազոտական ինստիտուտ  
ԵՊԲՀ, բժշկական կենսաբանության ամբիոն

Ստացված է՝ 20.07.2020, գրախոսված է՝ 25.08.2020, ընդունված է՝ 14.10.2020

**Բանալի բառեր՝** *ամոնիումի հիդրօքսիդ, սուլպերօքսիդ ռադիկալ, հիդրօքսիդային ռադիկալ, հիպերամոնեմիա:*

Ամոնիակը որոշակի դեր ունի օրգանիզմի ախտաբանական գործընթացներում: Լյարդի ցիռոզի դեպքում, երբ խախտվում է ամոնիակը միզանյութի փոխարկման գործընթացը, առաջանում են հիպերամոնեմիա և ուրեմիա [4, 6, 9]: Սակայն ամոնիումի հիդրօքսիդի առկայությունը ջրածնի պերօքսիդի ճեղքման և սուլպերօքսիդ ռադիկալների առաջացման առանձնահատկությունները բավարար լուսաբանված չեն: Հետազոտության նպատակն է *in vitro* պայմաններում բացահայտել ամոնիակի տոքսիկ ազդեցության մեխանիզմը ջրածնի պերօքսիդի առկայության պայմաններում և գնահատել գեներացված սուլպերօքսիդ ռադիկալների կենսաբժշկության մեջ կիրառման հեռանկարները:

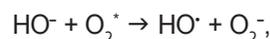
## Նյութը և մեթոդը

Հետազոտությունը կատարվել է ՀՀ ԳԱԱ կենսաբանության ինստիտուտի ակտիվ թթվածնի նյութափոխանակության լաբորատորիայում *in vitro* պայմաններում պրոֆ. Ս.Ա. Սիմոնյանի կողմից մշակված [1, 10] և հետագայում մոդիֆիկացված մեթոդով: 0,1M 5մլ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ը 0,01M ամոնիումի հիդրօքսիդի 5մլ-ի հետ տաքացնելով (7,4pH, 1-2 րոպե)՝ Էկզոթերմիկ ռեակցիայի պայմաններում ջրածնի պերօքսիդը ճեղքվում է: Այդ լուծույթը սառեցնելուց և սենյակային ջերմաստիճանում 5 րոպե ինկուբացիայից հետո գոյանում է կայուն, ստացիոնար կոնցենտրացիայով O<sub>2</sub><sup>-</sup>-ի լուծույթ: Վերջինս (0,1մ) ավելացնելով կոմասի բրիլիանտ կապույտի (ԿԲԿ) 5մլ ջրային լուծույթին՝ 37°C pH7,4-ում

15-20 րոպեի ընթացքում նկատվում է օպտիկական սպեկտրի առավելագույն կլանման (580 նմ) նվազում (գունաթափում): ԿԲԿ-ի դիտվող գունազրկումը O<sub>2</sub><sup>-</sup>-ով տվյալ ներկանյութի միաէլեկտրոն վերականգնման արդյունքն է: Համանմանությամբ 50-60°C-ում 5մլ 0,1M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ն 15 վրկ. տաքացնելով 5մլ 0,1M NH<sub>4</sub>OH-ի հետ (9,5pH)՝ դիտվում է բուռն Էկզոթերմիկ ռեակցիա, որը հասցնում է ջրածնի պերօքսիդի ճեղքման: Այդ լուծույթի սառեցումը սենյակային ջերմաստիճանում 5-6 ժամ հետո հասցնում է O<sub>2</sub><sup>-</sup>-ի գոյացման, որի ստացիոնար քանակը 2-3 ժամ հետո նվազում է 8-10%-ով: Ստացված լուծույթի վրա (0,1մ) ավելացնելով ԿԲԿ-ի 5-ական մլ ջրային լուծույթ՝ 37°C-ում 4-5 րոպեի ընթացքում (pH 9,5) առաջանում է առավելագույն օպտիկական կլանման նվազեցում (580 նմ): Առանձին H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ը կամ NH<sub>4</sub>OH-ը (5մլ, 37°C, pH9,5 1-1,5 ժամ) պրակտիկորեն չի նվազեցնում ԿԲԿ-ի օպտիկական կլանումը: Համանման արդյունք է ստացվում նշված համակարգում գոյացած սուլպերօքսիդ ռադիկալների ԷՊՈ սպեկտրների գրանցման արդյունքում [10]: ԿԲԿ կապույտի գունաթափումը մեծանում է ռեակցիոն խառնուրդի pH-ի և ջրածնի պերօքսիդի կոնցենտրացիայի մեծացմանը զուգընթաց: Ընդ որում՝ ջրածնի պերօքսիդի այս պայմաններում ճեղքման ընթացքում գոյանում է գրգռված թթվածին, որն ունակ է վերականգնվելու ամոնիումի հիդրօքսիդի էլեկտրոնով՝ դառնալով սուլպերօքսիդ ռադիկալ [1].

## Արդյունքների վերլուծությունը

Ըստ այն հանգամանքի, որ հիդրօքսիլ ռադիկալները կլանվում են միատոմ կամ բազմատոմ սպիրտներով և շաքարներով, վերջիններիս առկայությամբ գեներացված O<sub>2</sub><sup>-</sup>-երի քանակն աճում է շուրջ 40-50 անգամ: Ըստ այդմ՝ առաջարկվում է ջրածնի պերօքսիդի՝ ամոնիումի հիդրօքսիդի ճեղքման ընթացքում O<sub>2</sub><sup>-</sup> երի գոյացման հետևյալ մեխանիզմը.



### \* ՆԱՍԱԿԱԳՐՈՒԹՅԱՆ ՀԱՍՑԵ

Ս.Ս. Ֆեսչյան  
ԵՊԲՀ, բժշկական կենսաբանության ամբիոն  
Հասցե՝ ՀՀ, ք. Երևան, 0025, Կոբյունի 2  
Էլ. փոստ՝ feschyan.sona@mail.ru  
Հեռ.՝ (+374) 98 53 68 98

որտեղ  $O_2^{\cdot-}$ -ը «տաք թթվածնի» մոլեկուլն է, որն առաջանում է  $H_2O_2$ -ի էկզոթերմիկ ճեղքման արդյունքում, որը հեշտությամբ վերականգնվում է  $HO^{\cdot}$  խմբի էլեկտրոնով՝ առաջացնելով  $HO^{\cdot}$  և  $O_2^{\cdot-}$ : Իսկապես,  $HO^{\cdot}$ -ի դասական սկավենջերները (սպիրտ, շաքար) կտրուկ բարձրացնում են  $O_2^{\cdot-}$ -ի ստացիոնար խտությունը ռեակցիայի արագության հաստատունի կայուն մնալու պայմաններում: Հաշվի առնելով այն հանգամանքը, որ սուպերօքսիդները միաէլեկտրոն վերականգնում են  $ԿԲԿ$ -ն ստեխիոմետրային կերպով, հեշտ է որոշել ամոնիակով  $H_2O_2$ -ի ճեղքման արդյունքում  $O_2^{\cdot-}$ -ի քանակը:

### Եզրակացություն

Ամոնիակի առկայությամբ  $H_2O_2$ -ի ճեղքման արդյունքում  $O_2^{\cdot-}$  և  $HO^{\cdot}$  ռադիկալների գեներացիան, ըստ

եության, նրա տոքսիկ ազդեցության բացահայտման նոր, լրացուցիչ մեխանիզմ է՝ հիպերամոնիումեմիայով ուղեկցվող ախտաբանական վիճակների ախտաբանական գործընթացներում: Մշակվել է ամոնիակի ներգործությամբ ջրածնի պերօքսիդի ճեղքման և  $O_2^{\cdot-}$  ազատ ռադիկալի գեներացման ստացիոնար քանակի որոշման նոր կինետիկ եղանակ: Օգտագործելով այս եղանակը՝ կարելի է ստանալ  $O_2^{\cdot-}$ -երի կարգավորվող կայուն ստացիոնար քանակներ՝ ստեղծելով իրական հեռանկարներ՝ կենսաբժշկության տարբեր ոլորտներում դրանք կիրառելով որպես հակաբակտերիային, հակավիրուսային ազեոններ [2, 3, 5, 7, 8], ինչպես նաև որպես  $O_2^{\cdot-}$ -երով տարբեր կենսահամակարգերի վրա ունեցած ազդեցության մեխանիզմների նորովի գնահատման միջոց:

## ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՑԱՆԿ

1. Սիմոնյան Ռ.Մ., Սիմոնյան Գ.Մ., Սիմոնյան Մ.Ա. Կենսաբանորեն ակտիվ միացությունների սուպերօքսիդի համատաքային ակտիվության որոշման եղանակ: ՀՀ Մտավոր սեփականության գործակալություն, 2015, Գյուտի արտոնագիր N 2929
2. Akaïke T. Role of free radicals in viral pathogenesis and mutation. Rev. Med. Virol., 2001, 11, 2, :87-101
3. Cadet J., Wagner J.R.. DNA Base Damage by Reactive Oxygen Species, Oxidizing Agents, and UV Radiation. Cold Spring Harb Perspect Biol., 2013, 5, 2, a 012559, doi:10.1101/cshperspect.a0125559
4. Khan A., Ayub M., Khan W.M.. Hyperammonemia Is Associated with Increasing Severity of Both Liver Cirrhosis and Hepatic Encephalopathy Int. J. Hepatol., 2016, 3, doi: 10.1155/2016/6741754
5. Memar M.Y., Ghotaslou R., Samiei M, Adibkia K. Antimicrobial use of reactive oxygen therapy: current insights. Infection and Drug Resistance, 2018,11: 567- 576
6. Natesan V., Mani R., Arumugam R. Clinical aspects of urea cycle dysfunction and altered brain energy metabolism on modulation of glutamate receptors and transporters in acute and chronic hyperammonemia . Biomed Pharmacother., 2016, 81, 192-202
7. Peterhans E.. Reactive oxygen species and nitric oxide in viral diseases. Biological Trace Element Research, 1997, 56,107-116
8. Robinson J.M.. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. Histochem Cell Biol., 2008, 130, 2, 281-297
9. Shiraki M., Shimizu M. et al. Carnitine dynamics and their effects on hyperammonemia in cirrhotic Japanese patients. Hepatol.Res., /Epub ahead of print , 2016, Jun 2 doi: 10.1111/hepr. 12750.
10. Simonyan M.A. Reduction of some organic and inorganic oxidants in alkaline media by superoxide dismutase and scavengers of hydroxyl radicals. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1982, 108, 4, 1751-1756

## РЕЗЮМЕ

### КИНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУПЕРОКСИДНЫХ РАДИКАЛОВ ПРИ РАСЩЕПЛЕНИИ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА АММИАКОМ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНЕ

Симонян Р.М.<sup>1</sup>, Фесчан С.М.<sup>2</sup>, Енгибарян А.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана, НАН РА

<sup>2</sup>ЕГМУ, Кафедра медицинской биологии

**Ключевые слова:** гидроксид аммония, супероксидный радикал, гидроксидный радикал, гипераммониемия.

С использованием модифицированного метода проф. Симоняна М. А. был показан новый механизм токсического действия аммиака. Предложен новый кинетический метод определения супероксидных радикалов при расщеплении перекиси водорода аммиаком, который может быть приме-

нен при разных патологических состояниях, сопровождающихся гипераммониемией. Намечаются перспективы использования в биомедицине продуцируемых супероксидных радикалов как антибактериальные, противовирусные агенты и как факторы определения механизма действия супероксидов на различных биосистемах.

## SUMMARY

**THE KINETIC METHOD OF DEFINING SUPEROXIDE RADICALS PRODUCED DURING THE DECAY OF HYDROGEN PEROXIDE WITH AMMONIUM AND ITS APPLICATION IN MEDICINE**

Simonyan R.M.<sup>1</sup>, Feschyan S.M.<sup>2</sup>, Engibaryan A.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry after H. Buniatyan of RA NAS

<sup>2</sup>YSMU, Department of Medical Biology

**Keywords:** *ammonium hydroxide, superoxide radicals, hydroxyle radicals, hyperammonemia.*

By using the modified method of professor Simonyan M. A., a new mechanism of toxic action of ammonia has been shown. We introduce a new kinetic method for determining superoxide radicals produced during the splitting of hydrogen peroxide

with ammonia. This can be used in various pathological conditions accompanied with hyperammonemia. The use of produced superoxide radicals as antibacterial and antiviral agents in biomedicine and for determination of the mechanisms of influence of superoxides on various biosystems is planned.