

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ ԴԱՎԻԹ ՀԵՆՐԻԻ

ՈՐՈՇ ԴԵՂԱԲՈՒՅՍԵՐԻ ԷՔՍՏՐԱԿՏՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ԿԵՆՍԱՔԻՄԻԱԿԱՆ
ՄԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐԸ

Գ.00.04 – Կենսաքիմիա մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

Ս Ե Ղ Մ Ա Գ Ի Ր

ԵՐԵՎԱՆ 2014

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ОГАНЕСЯН ДАВИД ГЕНРИЕВИЧ

БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТОВ НЕКОТОРЫХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.04 – Биохимия

ЕРЕВАН 2014

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Ռուս-Հայկական (Սլավոնական) համալսարանում:

Գիտական ղեկավար՝ կենս. գիտ. դոկտոր,
պրոֆեսոր Հ. Ռ. Վարդապետյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր,
պրոֆեսոր Գ. Ս. Վարդանյան
կենս. գիտ. դոկտոր,
պրոֆեսոր Մ.Պ. Հովհաննիսյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության
ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2014թ. հունիսի 20-ին, ժամը 14⁰⁰ -ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2014թ. մայիսի 20-ին:

051 Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենս. գիտ. թեկնածու, դոցենտ՝ Մ. Ա. Փարսադանյան

Тема диссертации утверждена в Российско-Армянском (Славянском) университете

Научный руководитель: доктор биол. наук,
профессор Г. Р. Вардапетян

Официальные оппоненты: доктор биол. наук,
профессор Г. С. Варданян
доктор биол. наук,
профессор С. П. Оганесян

Ведущая организация: Институт молекулярной биологии НАН РА

Защита диссертации состоится 20-го июня 2014г., в 14⁰⁰ часов, на заседании Специализированного совета 051 по Биофизике ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукаяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 20-го мая 2014г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051
кандидат биологических наук, доцент

М.А. Парсаданян

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Одной из актуальных задач современной фитотерапии и биохимии растений является выявление активных компонентов растительных экстрактов, новых фитотерапевтических соединений и механизмов их действия. Растительные экстракты - это концентрированные препараты жидкой, сухой или промежуточной консистенции, обычно получаемые из высушенного растительного сырья (листьев, корней, плодов, почек, цветков, травы, коры и др.). Они представляют собой сбалансированные смеси биологически активных веществ, обладающих многосторонним действием. Экстракты растений имеют широкое применение как в качестве добавок к продуктам питания, так и в косметологии и медицине.

Целебные свойства экстрактов лекарственных растений обусловлены входящими в их состав компонентами, обладающими антиоксидантным, кардиопротекторным, противоопухолевым, противовоспалительным, антибактериальными и другими свойствами. Изучение биохимических и молекулярных механизмов действия лекарственных соединений является тем фундаментом, на котором может строиться терапия многих болезней, в том числе вирусных и опухолевых. Спектр биологической активности лекарственных растений определяется наличием в их составе веществ разных химических классов, подклассов и групп, которые могут обладать мультиплетным механизмом действия. Именно их количественный и качественный состав определяет доминирование и степень выраженности того или иного фармакологического эффекта конкретного растения и его выбор при назначении в качестве лечебного и профилактического средства.

В организме имеется собственная система борьбы с излишним количеством свободных радикалов, но она ослабляется под воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды. Растения содержат компоненты, обладающие антиоксидантной активностью. Природные антиоксидантные системы, выработанные в ходе эволюции, прошли испытание "на прочность" в течение многих миллионов лет.

Известно, что химические компоненты, входящие в состав того или иного растения, определяют его лечебные свойства. Любое растительное сырьё всегда содержит сложный набор первичных и вторичных соединений, которые определяют множественный характер действия лекарственных растений. В растениях существует значительное число метаболических путей, приводящих к образованию соединений, свойственных лишь определённым, иногда очень немногим группам. Эти реакции объединяются термином вторичный метаболизм, а продукты называются вторичными метаболитами. Обладая высокой биологической активностью, эти вещества участвуют в процессах обмена, выполняют «экологические» и защитные функции, предохраняя растения от различных вредителей, патогенов и т.д.

Фенольные и полифенольные соединения представлены группой вторичных метаболитов, которые часто встречаются в овощах, фруктах, вине, чае, шоколаде и других продуктах и имеют важное значение в питании человека. Они в основном являются производным и/или изомерами флавонов, изофлавонов, флавонолов, катехинов и фенольных кислот. Одной из групп биологически активных полифенольных растительных соединений являются биофлавоноиды. В последнее время растущий интерес к фенольным соединениям стал фокусироваться на их биологической активности, которая в основном относится к способности флавоноидов образовывать хелаты с металлами и их радикал-нейтрализующей активности.

Ключевым свойством флавоноидов является их антиоксидантная активность. Именно свойством флавоноидов подавлять развитие перекисного окисления липидов,

белков и нуклеиновых кислот обусловлена универсальность действия флавоноидов на факторы патогенеза большого числа заболеваний. Существует несколько универсальных особенностей, свойственных всем флавоноидам: подавление перекисных процессов, предотвращение образования токсичных продуктов, возникающих за счет образования супероксид радикалов и перекисей водорода. Флавоноиды защищают аскорбиновую кислоту, подобно хелаторам связывая ионы переходных металлов, ингибируют ферментативные реакции с продукцией супероксид радикалов и перекисей водорода, блокируя супреоксиддисмутазу и др.

Антиоксидантный эффект флавоноидов реализуется в основном по комбинированному механизму действия и зависит от структуры этих веществ. Показано, что флавоноиды имеют терапевтическое значение и предотвращают развитие многих заболеваний.

В последние годы стала крайне актуальной проблема борьбы с укусами змей с применением неспецифических антитоксических веществ, которая связана в основном с высокой стоимостью иммунотерапевтических противоядий, широко применяемых при змеиных укусах. В полевых условиях, где и происходит большинство укусов змей, отсутствуют условия для успешного хранения и применения иммунотерапевтических препаратов. Змеиные яды, вероятно, являются самыми известными ядами. Змеи дают человеку много лекарств, но, одновременно, тысячи людей ежегодно умирают от укусов ядовитых змей. Действие ядов разных змей может отличаться по действию на организм человека и быть нейротоксическим и гемовазотоксическим. Яд гюрзы вызывает широкий спектр патологических реакций организма, затрагивающих важнейшие системы и органы: центральную и периферическую нервную систему, сердечно-сосудистую и эндокринную системы, кровь и органы кроветворения, печень и почки.

Яд гадюковых проявляет в основном геморрагические и гемолитические свойства, а сильное повреждающее действие вызывает постоянный компонент любого змеиного яда – секреторная фосфолипаза А₂ (sPLA₂). Гемолизирующее действие этого фермента часто напрямую связано с превращением лецитина внешнего слоя мембраны эритроцитов в лизолецитин и арахидоновую кислоту. Лизолецитин является мембранолитиком и разрушает и миелиновую оболочку и мембрану нейрона, а арахидоновая кислота, как известно, является предшественником простагландинов и лейкотриенов. Одним из наиболее перспективных путей решения данной проблемы является конструирование или поиск новых препаратов, отвечающих ряду требований, таких как доступность в препаративных количествах, стабильность, отсутствие побочного действия и аллергических реакций и т.д.

Кверцетин является сильным антиоксидантом и относится к растительным флавоноидам. Кверцетин предотвращает дальнейшее негативное воздействие на организм свободных радикалов и восстанавливает мембраны поврежденных ими клеток. Помимо этого он обладает антибактериальным, противовоспалительным, противоотечным, спазмолитическим и антигистаминным действием.

Установлено, что кверцетин уменьшает содержание полиненасыщенных жирных кислот, тормозя активность катаболических ферментов, нарушающих структуру фосфолипидов мембран, способствует синтезу и стабилизации закиси азота, предотвращая от окисления. Показано, что кверцетин ингибирует активность sPLA₂, препятствуя взаимодействию яда с клеточными мембранами. Кроме того обнаружено, что кверцетин уменьшает хрупкость капилляров и, тем самым, предотвращает кровотечения у больных с геморрагическим васкулитом.

Исходя из вышесказанного, исследование возможности использования экстрактов растений для лечения последствий змеиных укусов и ран различной этиологии весьма актуально.

Цель и задачи исследования

Целью диссертационной работы являлось исследование антиоксидантных и антитоксических свойств экстрактов лавра благородного (*Laurus nobilis*), базилика душистого (*Ocimum basilicum*), подорожника большого (*Plantago major* L.), полыни горькой (*Artemisia absinthium*), зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum*) и боярышника обыкновенного (*Crataegus laevigata*), выявление их активных компонентов и определение биохимических механизмов их действия. С этой целью проводилось исследование качественного и количественного состава основных компонентов этанольных экстрактов вышеуказанных растений. Антиоксидические свойства экстрактов и их компонентов против действия яда гюрзы (*Macrovipera lebetina obtusa*) исследовались на ряде экспериментальных моделей *in vivo* и *in vitro*.

В соответствии с целью исследования были поставлены следующие задачи:

- Определить суммарное содержание флавоноидов в этанольных и водных экстрактах *P. major*, *A. absinthium*, *C. laevigata*, *L. nobilis*, *O. basilicum*, *H. perforatum*.
- Исследовать антирадикальную активность экстрактов *P. major*, *A. absinthium*, *C. laevigata*, *L. nobilis*, *O. basilicum*, *H. perforatum* на химической модели стабильного радикалаДФП.
- Исследовать влияние экстрактов на выживание мышей при внутрибрюшинном введении яда *Macrovipera lebetina obtusa*.
- Провести ВЭЖХ анализ этанольных экстрактов с наибольшей антиоксидической активностью с целью исследования их качественного и количественного состава.
- Исследовать влияние кверцетина на изменение пероксидазной активности гемоглобина под действием яда *Macrovipera lebetina obtusa in vitro*.
- Исследовать влияние кверцетина на изменения уровня аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), креатинина, фибриногена и тромбинового времени (ТВ) в плазме крови крыс при внутрибрюшинном введении яда *Macrovipera lebetina obtusa*.
- Определить ангиопротекторную активность кверцетина при геморрагических повреждениях сосудов микроциркуляторного русла мозга крыс, вызванных действием яда *Macrovipera lebetina obtusa in vivo*.

Научная новизна и практическая ценность

- Определена антирадикальная активность и общее количество флавоноидов спиртовых экстрактов *P. major*, *A. absinthium*, *C. laevigata*, *L. nobilis*, *O. basilicum*, *H. perforatum*.
- Впервые показана антиоксидическая активность экстрактов *C. laevigata*, *A. absinthium*, *P. major* на модели выживаемости мышей при внутрибрюшинном введении яда *Macrovipera lebetina obtusa*.
- Обнаружена прямая корреляция между содержанием кверцетина и антиоксидическим действием экстрактов *C. laevigata*, *A. absinthium*, *P. major* при отравлении ядом *Macrovipera lebetina obtusa*.
- Выявлена положительная корреляция между содержанием кверцетина в экстрактах *C. laevigata*, *A. absinthium*, *P. major* и их антирадикальной активностью.
- Показано, что *in vitro* действие яда *Macrovipera lebetina obtusa* приводит к уменьшению пероксидазной активности гемоглобина эритроцитов.
- Показано, что кверцетин способствует снижению уровня АСТ, АЛТ и креатинина в плазме крови крыс при внутрибрюшинном введении яда *Macrovipera lebetina obtusa*, но не влияет на изменения уровня фибриногена и ТВ.

На основании полученных результатов и основываясь на литературных данных нами предложена гипотетическая модель механизмов антиоксидического действия

экстрактов *C. laevigata*, *A. absinthium*, *P. major* против действия яда *Macrovipera lebetina obtusa*.

Практическая ценность диссертационной работы заключается в том, что полученные результаты носят как фундаментальный, так и практический характер и направлены на выявление интимных механизмов биологической активности экстрактов ряда лекарственных растений.

Полученные в данной работе результаты открывают новые возможности для дальнейших исследований в данной области. Полученные данные могут быть использованы в специальных лекционных курсах для студентов соответствующих кафедр ЕГУ, ЕГМУ, РАУ, а также в научных лабораториях, занимающихся исследованием лечебных свойств природных биологически активных соединений.

На защиту выносятся следующие основные положения

В этанольных экстрактах *P. major*, *A. absinthium*, *C. laevigata*, *L. nobilis*, *O. basilicum*, *H. perforatum* обнаружено высокое содержание флавоноидов. По общему содержанию флавоноидов экстракты можно построить в следующем убывающем ряду: *L. nobilis* > *C. laevigata* > *O. basilicum* > *H. perforatum* > *P. major* > *A. absinthium*.

Все исследуемые экстракты имеют высокую антирадикальную активность. Среди исследуемых экстрактов не выявлено корреляции между общим количеством флавоноидов и антирадикальной активностью.

Экстракты *C. laevigata*, *A. absinthium*, *P. major* увеличивают среднюю продолжительность жизни мышей при внутрибрюшинном введении яда *Macrovipera lebetina obtusa* в дозе 2.5ЛД₅₀.

Существует прямая корреляция между антирадикальной и антиоксидантной активностями экстрактов *C. laevigata*, *A. absinthium*, *P. major* и количественным содержанием кверцетина в них.

Действие яда *Macrovipera lebetina obtusa in vitro* на эритроциты приводит к значительным изменениям спектра поглощения гемоглобина эритроцитов и снижению его пероксидазной активности, однако присутствие кверцетина уменьшает воздействие яда на спектральные характеристики гемоглобина и на его пероксидазную активность, в частности.

Яд *Macrovipera lebetina obtusa* при внутрибрюшинном введении приводит к значительному повышению уровня АСТ, АЛТ, креатинина, снижению уровня фибриногена и увеличению ТВ в плазме крови крыс. Кверцетин способствует восстановлению уровня АСТ, АЛТ и креатинина, однако не влияет на изменения параметров коагуляционного гемостаза.

Кверцетин обладает мощным ангиопротекторным действием, значительно снижая степень повреждения сосудов головного мозга крыс, вызванного геморрагическим действием яда *Macrovipera lebetina obtusa*.

Апробация работы.

Материалы диссертации были доложены на международных и республиканских конференциях: Шестая годовичная научная конференция РАУ (Ереван 2011), международная научная конференция “Ломоносов” (Москва 2011), международная научная конференция “Ломоносов” (Москва 2012), международный аспирантский форум “Современная наука: тенденции развития, проблемы и перспективы” (Ереван 2013), а также на семинарах кафедры Молекулярно-клеточной биологии и медицинской биохимии РАУ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 статей и тезисов.

Объем и структура работы. Работа изложена на 108 страницах, содержит 12 таблиц и 38 рисунков. Библиография включает 217 наименований литературных источников. Работа

состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы приводятся: общее описание, характеристика, происхождение и медицинское применение Базилика душистого (*Ocimum basilicum*), Зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum*), Лавра благородного (*Laurus nobilis*), Подорожника большого (*Plantago major*), Полыни горькой (*Artemisia absinthium*), Боярышника обыкновенный (*Crataegus laevigata*). Обсуждаются вторичные метаболиты и их роль в биологии и медицине. Приводятся общая характеристика флавоноидов, кверцетина и его свойств. Отдельный раздел посвящен составу и свойствам яда гюрзы (*Macrovipera lebetina obtusa*). Краткие содержания остальных глав приводятся ниже.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Сбор и хранение растительного материала

Объектами исследования являлись растения, прорастающие на территории РА: лавр благородный (*Laurus nobilis*), базилик душистый (*Ocimum basilicum*), подорожник большой (*Plantago major* L.), полынь горькая (*Artemisia absinthium*), зверобой продырявленный (*Hypericum perforatum*), боярышник обыкновенный (*Crataegus laevigata*). Растительный материал, предварительно стерилизованный в 1% (V/V) растворе гипохлорида натрия, высушивали до 10% влажности.

Определение относительной влажности листьев

Листья предварительно стерилизовали в 1% (V/V) гипохлорита натрия, сушили до 10% влажности, замораживали и хранили при -20°C для анализов. Относительную влажность листьев (ОВЛ) оценивали по методу (Ekanayake et al., 1993) и рассчитывали по следующей формуле: $\text{ОВЛ} = (\text{сырой вес} - \text{сухой вес}) / (\text{набухший вес} - \text{сухой вес}) \times 100\%$.

Приготовление экстрактов

Порошок из высушенных листьев (1г) смешивали с 70% этанолом или дистиллированной водой в соотношении 1:10 (г/мл) и инкубировали при комнатной температуре в течение 24-х часов. Экстракты центрифугировали в течение 5 мин при 13000 об/мин.

Определение общего количества флавоноидов в экстрактах проводили колориметрическим методом (Hollman and Katan, 1999), при длине волны 430 нм на спектрофотометре UV/Vis (JENWAY 6405, Germany).

Антирадикальную активность (АРА)

АРА экстрактов измеряли колориметрическим методом с использованием стабильного радикала ДФПГ (Fluka) (Mensor et al., 2001). Значение IC_{50} показывающее концентрацию экстракта в 1мл раствора ДФПГ, необходимую для тушения 50% радикала, определяли из дозо-зависимых кривых АРА.

Антиоксический тест

В исследованиях были использованы самцы белых мышей весом 22-25г. Токсичность яда и антиоксический эффект фитопрепаратов определялись с учётом времени выживания при внутрибрюшинном введении мышам раствора яда гюрзы в физиологическом растворе в дозе 5мг/кг массы (2,5 ЛД₅₀) и последующем, сразу после введения яда, внутрибрюшинном введении фитопрепаратов. При работе с животными соблюдались все требования, предъявляемые Комитетом по этике.

Анализ экстрактов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Анализ исследуемых образцов выполняли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Shimadzu Lc-20 (Shimadzu, Япония) со спектрофото-

метрическим SPD-20A и диодно-матричным SPD-M20A детекторами при 370 нм и программным обеспечением обработки данных ChemStation.

Действия яда гюрзы на гемоглобин

Объектом исследований являлись эритроциты крови человека. Число эритроцитов определяли спектрофотометрически при 680 нм, L=1 см на спектрофотометре JENWAY 6405. В конечных образцах оно составляло $1,8 \times 10^6$ кл/мл (ОП = 0,193). Для всех групп образцов измеряли спектры поглощения в области 200-800 нм.

Определение пероксидазной активности гемоглобина

Измерение активности пероксидазы гемоглобина проводили при 25°C при длине волны 610 нм (Vardapetyan et al., 2008).

Определение биохимических параметров и коагуляционного гемостаза плазмы крови крыс

Опыты ставились на самцах здоровых беспородных белых крыс весом 200-220г. При работе с животными соблюдались все требования, предъявляемые Комитетом по этике.

Определение АЛТ

Определение АЛТ в плазме крови крыс проводили по методу Варбурга при помощи автоматического анализатора Cobas Integra 400 Plus (Roche, Швейцария) в соответствии с протоколом Международной федерации клинической химии (IFCC), с применением пиридоксаль-5-фосфата (Bergmeyer et al., 1986).

Определение АСТ

Определение АСТ в плазме крови крыс проводилось на автоматическом анализаторе Cobas Integra 400 Plus в соответствии с протоколом IFCC, но без пиридоксаль-5-фосфата (Bergmeyer et al., 1986).

Определение креатинина в плазме

Определение креатинина в плазме крови крыс проводилось на анализаторе Cobas Integra 400 Plus колориметрическим методом (Junge et al., 2004).

Определение ТВ и фибриногена в плазме

Измерение количества фибриногена проводили по методу (Clauss, 1957), ТВ оценивали на автоматическом анализаторе коагуляции MG 1410 (Maroche, Италия).

Гистохимический анализ

Геморрагический статус срезов мозга подопытных животных оценивали при помощи гистохимического метода с использованием свежих замороженных срезов, фиксированных в 5% растворе формальдегида (Чилингарян и соавт., 1986) и программного пакета (Image Repair 3.19.) (Асатрян et al., 2007).

Статистическая обработка данных

Статистический анализ материала проводили на основе комплексного применения стандартных статистических методов: вычисления средних значений, стандартных отклонений, стандартных средних ошибок. Биологическая повторность опытов 4-6 кратная при проведении 2-3 серий опытов в каждом. В таблицах, на графиках и диаграммах приведены средние арифметические данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание флавоноидов в растительных экстрактах

Результаты определения общего количества флавоноидов в спиртовых экстрактах представлены в таблице 1. Как видно из таблицы, наибольшее общее количество флавоноидов среди исследованных экстрактов было обнаружено в экстракте *L. nobilis* (9.9 мг/мл), а наименьшее количество было показано в экстракте *A. absinthium* (2.1 мг/мл).

По общему содержанию флавоноидов экстракты можно построить в следующем ряду убывания: *L. nobilis* > *C. laevigata* > *O. basilicum* > *H. perforatum* > *P. major* > *A. absinthium*

Таблица 1.

Общее количество флавоноидов и IC_{50} экстрактов.

Образцы	Флавоноиды (мг/мл)	IC_{50} (μл/мл)
<i>P. major</i>	3.9 ± 0.08	12.5 ± 0.14
<i>A. absinthium</i>	2.1 ± 0.06	45 ± 0.52
<i>C. laevigata</i>	8.2 ± 0.11	35 ± 0.38
<i>L. nobilis</i>	9.9 ± 0.13	40 ± 0.45
<i>O. basilicum</i>	6.8 ± 0.09	156 ± 0.89
<i>H. perforatum</i>	5.9 ± 0.08	27 ± 0.35

Антирадикальная активность экстрактов

Как видно из рисунка 1, радикал-нейтрализующая активность всех экстрактов проявляет дозо-зависимый характер. Из исследуемых экстрактов наивысшая АРА была выявлена у *C. laevigata* (IC_{50} = 12.5 μл/мл), а наименьшая - у экстракта *O. basilicum* (IC_{50} = 156 μл/мл).

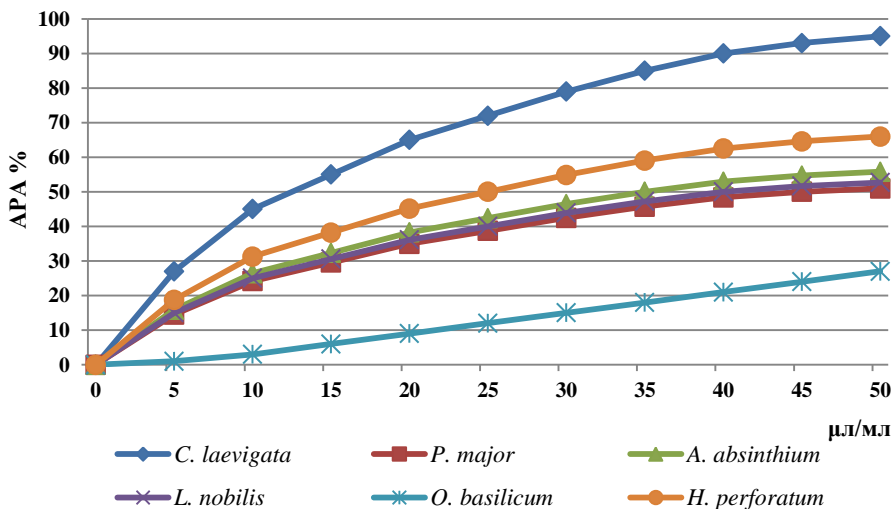


Рис. 1. Антирадикальная активность исследуемых экстрактов.

Общее количество флавоноидов и антирадикальная активность экстрактов представлены в таблице 1 и на рисунке 2. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что в исследованных экстрактах не наблюдается корреляции между АРА и общим количеством флавоноидов в них.

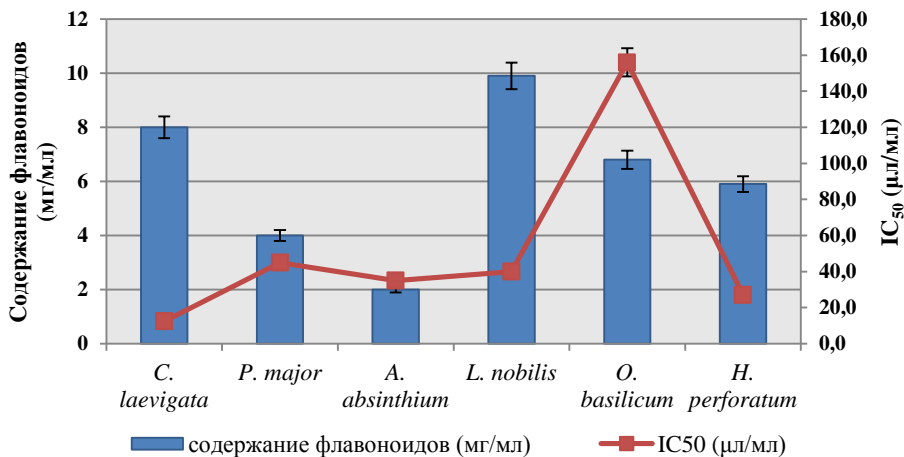


Рис. 2. Содержание флавоноидов и значение IC₅₀ этанольных экстрактов *C. laevigata*, *P. major*, *A. absinthium*, *L. nobilis*, *O. basilicum*, *H. perforatum*.

Антитоксический тест

При исследовании влияния растительных препаратов на выживаемость мышей при внутрибрюшинном введении яда, определялись два параметра - количество выживших животных и средняя продолжительность жизни погибших животных.

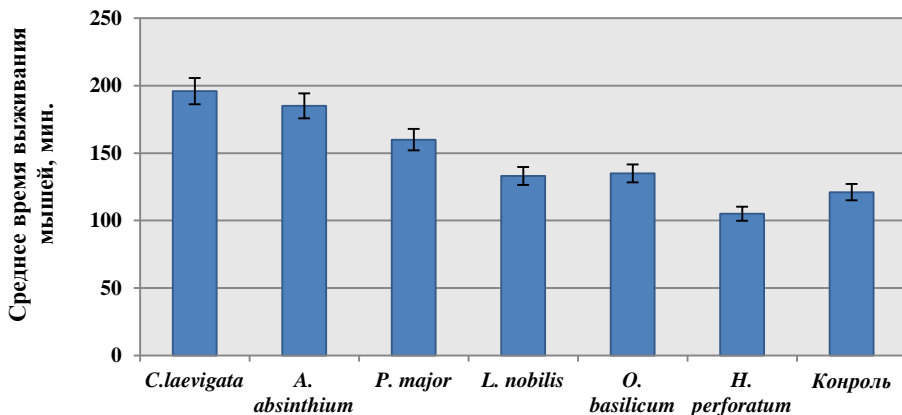


Рис.3. Динамика выживаемости мышей после введения яда и экстрактов *C. laevigata*, *A. absinthium*, *P. major*, *L. nobilis*, *O. basilicum*, *H. perforatum*.

Полученные результаты представлены на рисунке 3. Следует отметить, что ни в одной из групп не было отмечено выживания после 5 часов с момента инъекции яда и растительных экстрактов, однако наблюдалось увеличение средней продолжительности жизни у животных которым вводили экстракты *C.laevigata*, *A. absinthium*, *P. major* по сравнению с контрольной группой на 62%, 53%, 32%, соответственно.

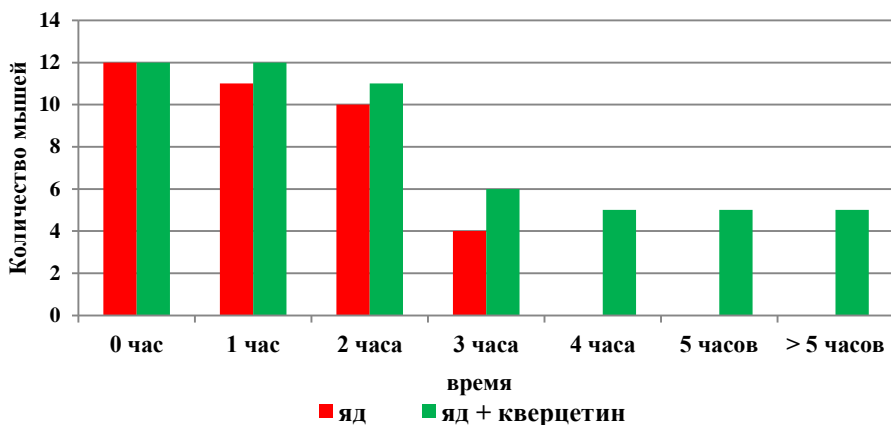


Рис. 4. Влияние кверцетина на выживаемость мышей после введения яда.

При использовании кверцетина в качестве антитоксического препарата за подопытными животными наблюдали в течение 24 часов. Спустя 24 часа после внутрибрюшинного введения кверцетина и яда гюрзы из 12 мышей 5 мышей остались в живых. На рисунке 4 показана динамика выживаемости мышей в течение 5 часов.

Анализ экстрактов методом ВЭЖХ

В экстракте *C. laevigata* были идентифицированы: рутин, кверцетрин, кверцетин. Хроматограмма экстракта *C. laevigata* показана на рисунке 5. В экстракте *P. major*: рутин, кверцетрин, морин, кверцетин. В экстракте *A. absinthium* все выбранные фенольные соединения были идентифицированы, кроме рутина. Общими для всех исследуемых экстрактов были только кверцетин и кверцетрин. Количественное содержание кверцетина показано в таблице 2.

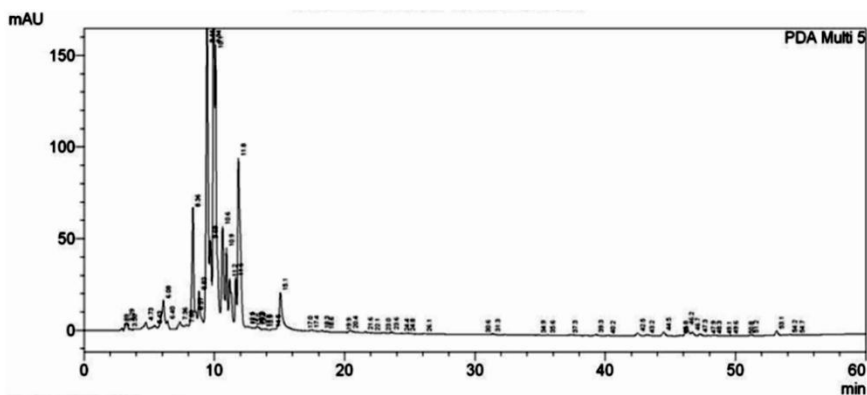


Рис. 5. Хроматограмма спиртового экстракта *C. laevigata*.

Стоит отметить, что в исследованных экстрактах не выявлено корреляции между общим количеством флавоноидов и антиоксидантной активностью (рис. 2). Однако, несмотря на то, что АРА растительных экстрактов является результатом комбинированного действия их многочисленных компонентов, после определения количества

кверцетина в экстрактах *A. absinthium*, *P. major* и *C. laevigata* была выявлена прямая корреляция между количеством кверцетина и АРА, что очевидно может свидетельствовать о значительной роли кверцетина в радикалингибирующей активности исследуемых экстрактов (рис. 6).

Таблица 2.

Значения IC_{50} , суммарное содержание флавоноидов и кверцетина в этанольных экстрактах *C. laevigata*, *P. major*, *A. absinthium*.

Экстракт	IC_{50} (μ л/мл)	Общее содержание флавоноидов (мг/мл)	Содержание кверцетина (μ г/мл)
<i>Crataegus laevigata</i>	12.5 \pm 0.08	8.09 \pm 0.07	7.47 \pm 0.2
<i>Plantago major</i>	45.0 \pm 0.1	3.97 \pm 0.04	2.77 \pm 0.8
<i>Artemisia absinthium</i>	35.0 \pm 0.1	2.05 \pm 0.04	4.03 \pm 0.12

Таблица 3.

Содержание фитокомпонентов (в %) в спиртовых экстрактах *A. absinthium*, *P. major* и *C. laevigata*.

Фитокомпоненты	Время удерживания	Содержание %		
		<i>A. absinthium</i>	<i>P. major</i>	<i>C. laevigata</i>
Рутин	3.2	-	1.9486	0.5496
Кверцетрин	6.1	0.8527	1.4937	2.2524
Морин	13.4	0.4463	1.0345	-
Кверцетин	15.1	2.3736	1.3591	3.3459
Апигенин	17.5	2.3392	-	-
Кемпферол	18.3	1.0318	-	-

Кроме того полученные нами данные свидетельствуют о корреляции между антиоксидантической активностью экстрактов и количеством кверцетина в них.

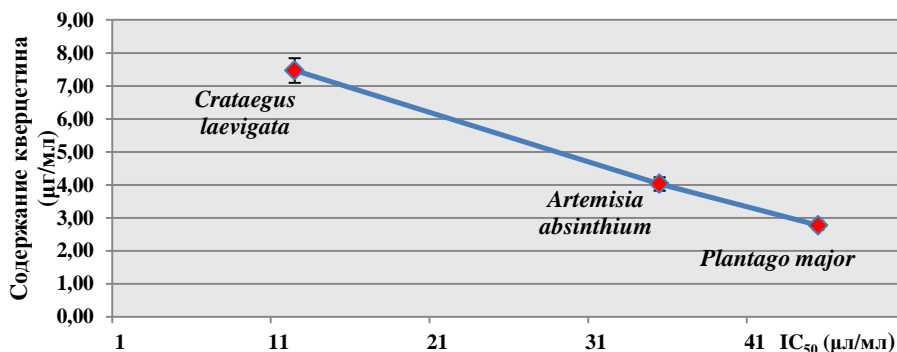


Рис. 6. Значение IC_{50} и содержание кверцетина этанольных экстрактов *C. laevigata*, *P. major*, *A. absinthium*.

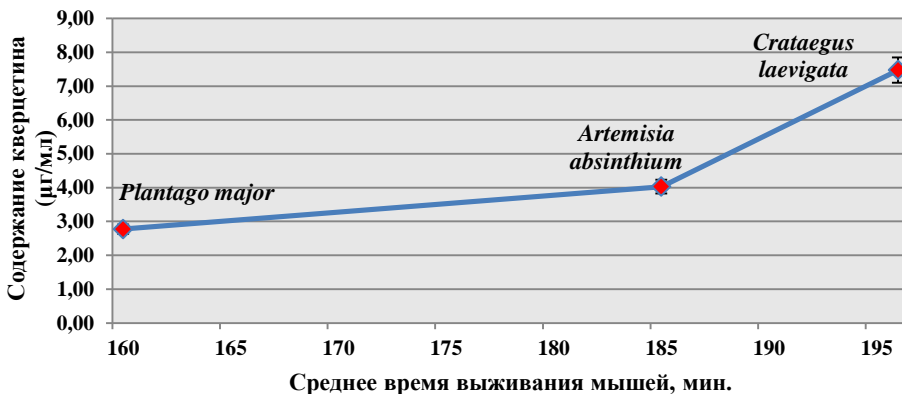


Рис. 7. Средняя продолжительность жизни мышей и содержание кверцетина в этанольных экстрактах *C.laevigata*, *P. major*, *A.absinthium*.

На рисунке 7 приведены данные содержания кверцетина в экстрактах *A. Absinthium*, *P. major* и *C. laevigata* и средняя продолжительность жизни мышей после внутрибрюшинного введения яда гюрзы совместно с экстрактами.

Спектральный анализ суспензии эритроцитов

Оптическая плотность при длине волны 413 нм в образце 1 (эритроциты обработанные ядом) составляла 1.435 ± 0.028 , в образце 2 (эритроциты обработанные ядом и кверцетином) - 1.209 ± 0.029 , в образце 3 (контрольный образец) - 1.083 ± 0.028 . Оптическая плотность при длине волны 543 нм в образце 1 - 0.774 ± 0.024 , в образце 2 - 0.531 ± 0.022 , в образце 3 - 0.345 ± 0.018 . Оптическая плотность при длине волны 577 нм в образце 1 - 0.803 ± 0.023 , в образце 2 - 0.525 ± 0.021 , в образце 3 - 0.347 ± 0.017 . Присутствие кверцетина в суспензии эритроцитов значительно снижает изменения в спектре поглощения, вызванные действием яда гюрзы.

Определение пероксидазной активности гемоглобина

Гемоглобин, как известно, обладает пероксидазной активностью, которая выражается в том, что, подобно ферменту, гемоглобин переносит кислород перекиси на субстрат, не способный самопроизвольно окисляться этой перекисью. Поскольку изменение протетической группы может отражаться на кислородсвязывающих параметрах и антиоксидантной пероксидазной активности гемоглобина, нами определялась также пероксидазная активность в вышеприведенных образцах.

Пероксидазная активность гемоглобина контрольного образца составляла 0.42 ± 0.022 единицы, пероксидазная активность образца обработанного совместно с кверцетином и ядом - 0.35 ± 0.02 единиц и при обработке только ядом - 0.21 ± 0.018 .

Как видно из полученных нами данных, действие яда гюрзы отражается на пероксидазной активности гемоглобина, в значительной мере уменьшая ее, что может быть следствием снижения кислородсвязывающих параметров гемоглобина.

Добавление же кверцетина в значительной степени отражается на восстановлении антиоксидантных свойств гемоглобина в исследуемых образцах.

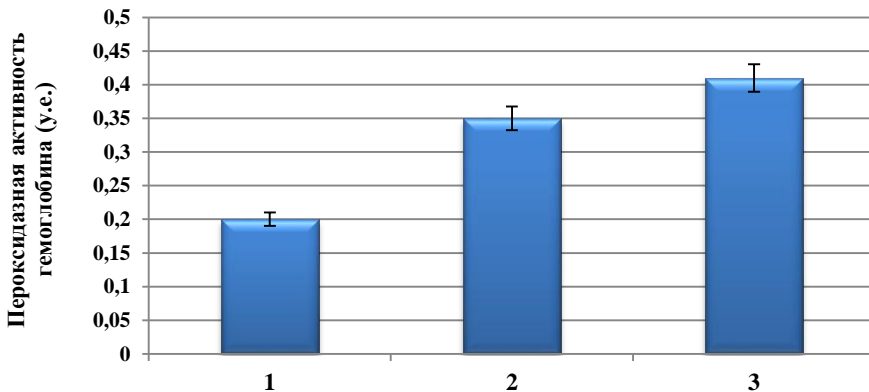


Рис. 8. Пероксидазная активность гемоглобина: 1 – образца, обработанного ядом; 2 – обработанного совместно кверцетином и ядом; 3 – контрольного образца.

Определение биохимических параметров и коагуляционного гемостаза плазмы крови крыс

Показано, что введение нелетальных доз яда песчаной эфы (семейство гадюковых) вызывает значительное увеличение уровня АЛТ и АСТ в плазме крови крыс, сопровождающее нарушения функции печени (Nabi и Rahmy, 1992), а увеличение концентрации креатинина является показателем повреждения почек (Thomas et al., 2011). Кроме того, показано, что яд ряда видов гадюковых приводит к геморрагическому эффекту и значительному снижению уровня фибриногена и других факторов свертывания крови (Ho et al., 1993). Однако, практически отсутствуют аналогичные данные относительно действия яда гюрзы (*M. lebetina obtusa*), обитающей на территории Армении.

Определение активности АЛТ

Полученные нами результаты измерения уровня АЛТ в крови крыс приведены на рисунке 9 и в таблице 4. Результаты исследования показали, что у животных через час после внутрибрюшинного введения яда гюрзы наблюдалось повышение уровня АЛТ в 6.1 раза по сравнению с контрольной группой, в группе же животных которым вводили кверцетин и яд, было зафиксировано повышения уровня АЛТ в 4.3 раза.

Определение активности АСТ

Повышение уровня АСТ и АЛТ в плазме крови подопытных животных может свидетельствовать о повреждающем действии яда на гепатоциты и клетки миокарда. Полученные нами результаты выявили повышение уровня АСТ в крови крыс в 3.4 раза спустя час после внутрибрюшинного введения яда гюрзы, в то время, как у животных которым вводили кверцетин и яд повышения уровня АСТ наблюдалось лишь в 2.6 раз по сравнению с контрольной группой. Результаты измерения уровня АСТ в крови крыс показаны на рисунке 9 и в таблице 4.

Определение креатинина в плазме

Полученные нами результаты измерения количества креатинина в крови крыс показаны на рисунке 9 и в таблице 4 и свидетельствуют о повышении количества

креатинина в крови у животных, которым внутрибрюшинно вводился яд гюрзы по сравнению с контрольной группой в 3.25 раз, в то время как при совместном введении яда и кверцетина, уровень креатинина был выше нормы всего в 2.1 раза.

Таблица 4.

Значения АСТ, ТВ, креатинина, АЛТ, фибриногена в плазме крови крыс контрольной группы (норма), и которым внутрибрюшинно вводился кверцетин и яд и животных после введения яда гюрзы.

Образец	АСТ (ед/дл)	ТВ (сек)	Креатинин (мг/л)	АЛТ (ед/дл)	Фибриноген (мг/мл)
Норма	5.7±0.2	12.1±0.4	4±0.1	2.4±0.2	1.9±0.1
Кверцетин + яд	14.8±0.5	17.9±0.6	9±0.4	10.3±0.5	1.1±0.05
Яд	19.7±0.4	17.7±0.6	13±0.3	14.4±0.4	1.2±0.03

Определение ТВ и фибриногена в плазме

Нами было исследовано влияние кверцетина на уровень фибриногена и ТВ в плазме крови крыс после внутрибрюшинного введения яда MLO (рисунок 9, таблица 4). Из полученных данных следует, что яд гюрзы приводит снижению концентрации фибриногена в плазме крови крыс и увеличению томбинового времени на 37% и 46% соответственно. Полученные результаты не выявили разницы в исследуемых коагулометрических параметрах между группами животных, которым вводили только яд и яд совместно с кверцетином.

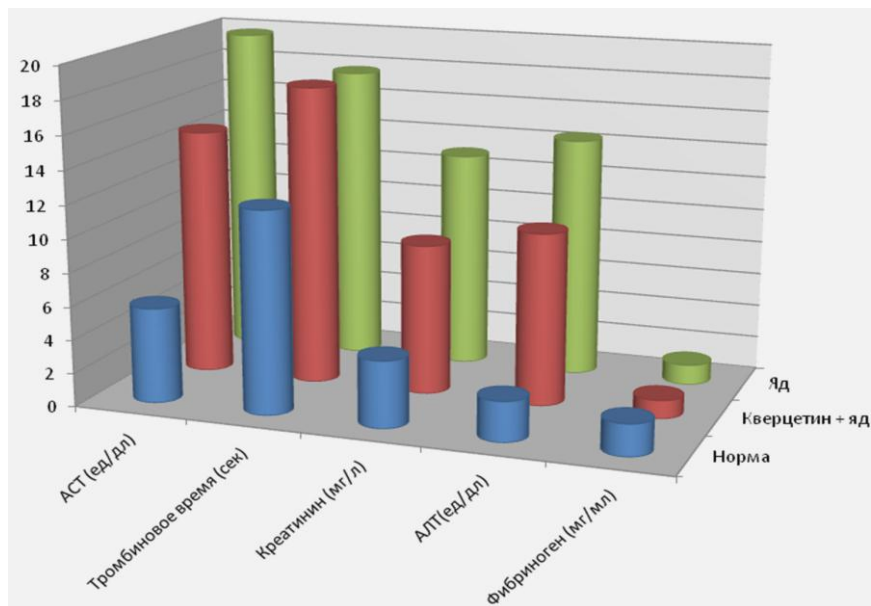


Рис. 9. Значения АСТ, ТВ, креатинина, АЛТ, фибриногена в плазме крови животных контрольной группы (норма), группы, в которой внутрибрюшинно вводился яд совместно с кверцетином и группы животных, которым вводился только яд.

Гистохимический анализ

На рисунке 10 а и б представлены микрофотографии срезов головного мозга крыс. Принимая площадь поврежденных участков за 100%, рассчитывали аналогичные данные как для интактных мышей, так и для мышей, которым вводили яд совместно с кверцетином. Выявлено значительное ангиопротекторное действие кверцетина, выражающееся в уменьшении площади поврежденных зон на 49.7%.

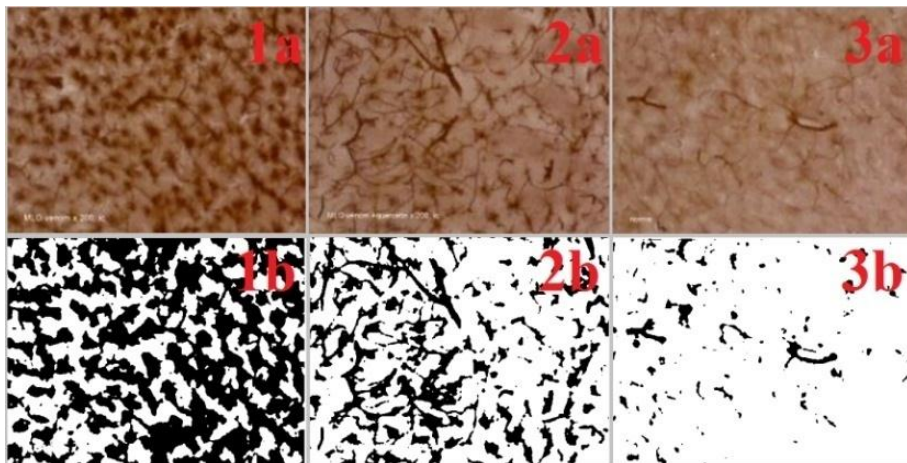


Рис. 10. а) Микрофотографии срезов мозга крыс (x 200) после введения 1 - яда, 2 - кверцетина совместно с ядом, 3 - интактных животных. б) Бинарифицированные изображения срезов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Флавоноиды являются вторичными метаболитами растительного происхождения, представляющими обширный класс низкомолекулярных полифенолов. Они обладают широким спектром биологического действия, включающим антиоксидантное, антибактериальное, антивирусное, антигрибковое, защищают от УФ-облучения, модифицируют ферментативные реакции. Флавоноиды проявляют иммуномодулирующую и противовоспалительную, антиастматическую, антигистаминовую, противоопухолевую, гепатопротекторную и др. активности. Считается, что в основе большей части физиологического действия фенольных соединений лежат их антиоксидантные свойства, заключающиеся в способности реагировать со свободорадикальными соединениями, образующимися в условиях окислительного стресса.

Среди исследованных нами экстрактов лавра благородного (*L. nobilis*), базилика душистого (*O. basilicum*), подорожника большого (*P. major* L.), полыни горькой (*A. absinthim*), зверобоя продырявленного (*H. perforatum*) и боярышника обыкновенного (*C. laevigata*), наибольшее суммарное количество флавоноидов было обнаружено в экстракте лавра благородного (9.9 мг/мл), а наименьшее - в экстракте полыни горькой (2.1 мг/мл). Несмотря на то, что флавоноиды являются сильными антиоксидантами, в исследуемых нами экстрактах в целом не было обнаружено прямой зависимости между общим содержанием флавоноидов и антирадикальной активностью. Не исключен,

конечно, и вклад в антирадикальную активность экстрактов компонентов нефлавоноидного происхождения, таких как, например, терпены и терпеноиды.

Из изученных нами спиртовых экстрактов растений наивысшую АРА на модели тушения свободного радикала ДФПГ проявлял экстракт *C. laevigata* ($IC_{50}=12.5$ μ л/мл), а наименьшую – экстракт *O. basilicum* ($IC_{50}=156$ μ л/мл).

Биологическая активность экстрактов как антиоксидантных агентов против действия яда *Macrovipara lebetina obtusa* была изучена на модели выживаемости мышей при внутрибрюшинном введении яда в дозе 2.5ЛД₅₀.

Результаты антиоксидантного теста показали, что ни в одной из групп не наблюдалось выживания мышей уже после 5 часов с момента введения яда. Однако было отмечено увеличение средней продолжительности жизни животных, которым были введены экстракты *C.laevigata*, *A. Absinthium*, *P. major* по сравнению с группой животных, которым вводили только яд, на 62%, 53%, 32%, соответственно

На основании данных, полученных после антиоксидантного теста на модели выживания мышей, в экстрактах, проявивших наибольшую биологическую активность в увеличении средней продолжительности жизни подопытных животных, с помощью ВЭЖХ был проведен качественный и количественный анализ ряда полифенольных соединений. Полученные данные ВЭЖХ анализа свидетельствуют о том, что из исследуемых компонентов только два компонента - кверцетин и кверцетрин представлены во всех трех исследуемых экстрактах.

Примечательно, что количество кверцетина в экстрактах и их антирадикальная и антиоксидантная активность находятся в прямой зависимости, что может свидетельствовать о значительной роли кверцетина в антирадикальной и антиоксидантной активности экстрактов *C.laevigata*, *A. absinthium*, *P. major*.

Нами было исследовано действие цельного яда и кверцетина на суспензию эритроцитов *in vitro*, в частности на спектрофотометрические параметры, а также пероксидазную активность гемоглобина, полученного из лизатов эритроцитов.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что яд MLO вызывает значительные изменения спектральных характеристик эритроцитов, в частности, приводит к уменьшению оптической плотности полосы Сорэ, что может свидетельствовать об изменениях в протетической группе гемоглобина, вызванных действием компонентов яда. Свидетельством этого может являться и то, что пероксидазная активность гемоглобина эритроцитов, обработанных ядом гюрзы, также изменяется, уменьшаясь по сравнению с активностью контрольного образца в 2.1 раза. При совместной обработке эритроцитов ядом и кверцетином, наблюдается значительное протекторное действие кверцетина на пероксидазную активность гемоглобина, которая снижается по сравнению с контрольным образцом всего в 1,2 раза.

Яд гадюковых оказывает в основном геморрагическое и гемолитическое действие (Gasmí et al., 1994), металлопротеиназы змеиного яда разрушают важные компоненты базальной мембраны и внеклеточного матрикса, такие как ламинин и коллаген IV типа (Baramova et al., 1990; Mashiko et al., 1998). Результаты нашего исследования показали, что при внутрибрюшинном введении яда MLO через час после инъекции наблюдалось значительное увеличение уровня АСТ, АЛТ, креатинина, снижение уровня фибриногена и увеличение ТВ в плазме крови крыс. Кверцетин способствует снижению уровня АСТ, АЛТ и креатинина, однако не влияет на изменения параметров коагуляционного гемостаза по сравнению с контрольной группой. При одновременном введении раствора кверцетина и яда в плазме крови животных было выявлено снижение уровня АСТ, АЛТ и креатинина по сравнению с животными, которым вводили только яд на 24.9%, 28.5% и 30.8%, соответственно.

Данные полученные на основании гистохимического анализа срезов мозга крыс после внутрибрюшинного введения яда гюрзы наглядно демонстрируют геморрагическое действие яда на микроциркуляторное русло мозга крыс. При совместном введении яда и кверцетина наблюдалось значительное уменьшение зоны геморрагического повреждения (49.7%) по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о выраженной антигеморрагической активности кверцетина против действия яда MLO на сосуды головного мозга крыс.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что кверцетин может играть важную роль в антирадикальной и антиоксидантной активности экстрактов *C.laevigata*, *A. absinthium*, *P. major*.

Яд гюрзы является геморрагическим токсином, в котором основными компонентами являются ферменты. sPLA2 яда гюрзы является гемолитическим и некротическим токсином, разрушающим мембраны эритроцитов и клеток, также значительную долю токсического воздействия яда обеспечивают продукты распада липидов под воздействием sPLA2, такие как арахидоновая кислота и лизофосфолипиды (Tsai et al., 2007). Они вызывают воспалительную реакцию, дестабилизируют мембраны клеток, запускают каскад воспалительных цитокинов, стимулируя агрегацию тромбоцитов.

Кверцетин обладает способностью ингибировать широкий спектр различных ферментов (Lindahl et al., 1993), а также является ангиопротектором, увеличивает прочность сосудов и оказывает стабилизирующее действие на мембрану эндотелиальных клеток капилляров (Atalik et al., 2010). Кверцетин способен ингибировать sPLA2 яда тропической гремучей змеи, снижая ее активность приблизительно на 40% (Cotrim et al., 2011). Исследования последних лет показали, что кверцетин ингибирует активность циклооксигеназы-1 (COX-1), тем самым уменьшая агрегацию тромбоцитов и снижая уровень воспалительных процессов (Dongmo et al., 2007). Одновременно кверцетин увеличивает активность COX-2, продуцирующего простагландин I₂. Последний препятствует выходу тромбоксана A₂ из тромбоцитов, агрегации тромбоцитов и сужению сосудов. Т.е. способствует нормализации и стабилизации функционирования эндотелия, расширению сосудов. А это в свою очередь, предотвращает протромботическое, провоспалительное и прооксидантное действие.

Чрезмерное высвобождение свободных жирных кислот под действием sPLA2 повышает уровень простагландинов (Chalimoniuk et al., 2012) и приводит к образованию свободных радикалов и провоспалительных цитокинов.

Кверцетин также ингибирует липоксигеназу, прекращая поступление оксипиринов в эндотелий сосудов. Также кверцетин сам нейтрализует оксипириды и образующиеся в их присутствии радикалы. Обладая высокой АРА, кверцетин нейтрализует активные формы кислорода (АФК), перекисные и гидроксильные радикалы (Traka et al., 2011), образующиеся в результате действия sPLA2.

На основании полученных результатов и основываясь на литературных данных нами была предложена гипотетическая модель механизмов антиоксидантного действия экстрактов против действия яда MLO, представленная на рисунке 11. Схема включает в себя возможные механизмы действия кверцетина, как одного из активных компонентов экстрактов, выраженная ингибированием активности sPLA2, стабилизирующим действием кверцетина на мембраны клеток эндотелия, также ингибированием активности COX-1 и липоксигеназы-5, стимулированием активности COX-2 и АРА.

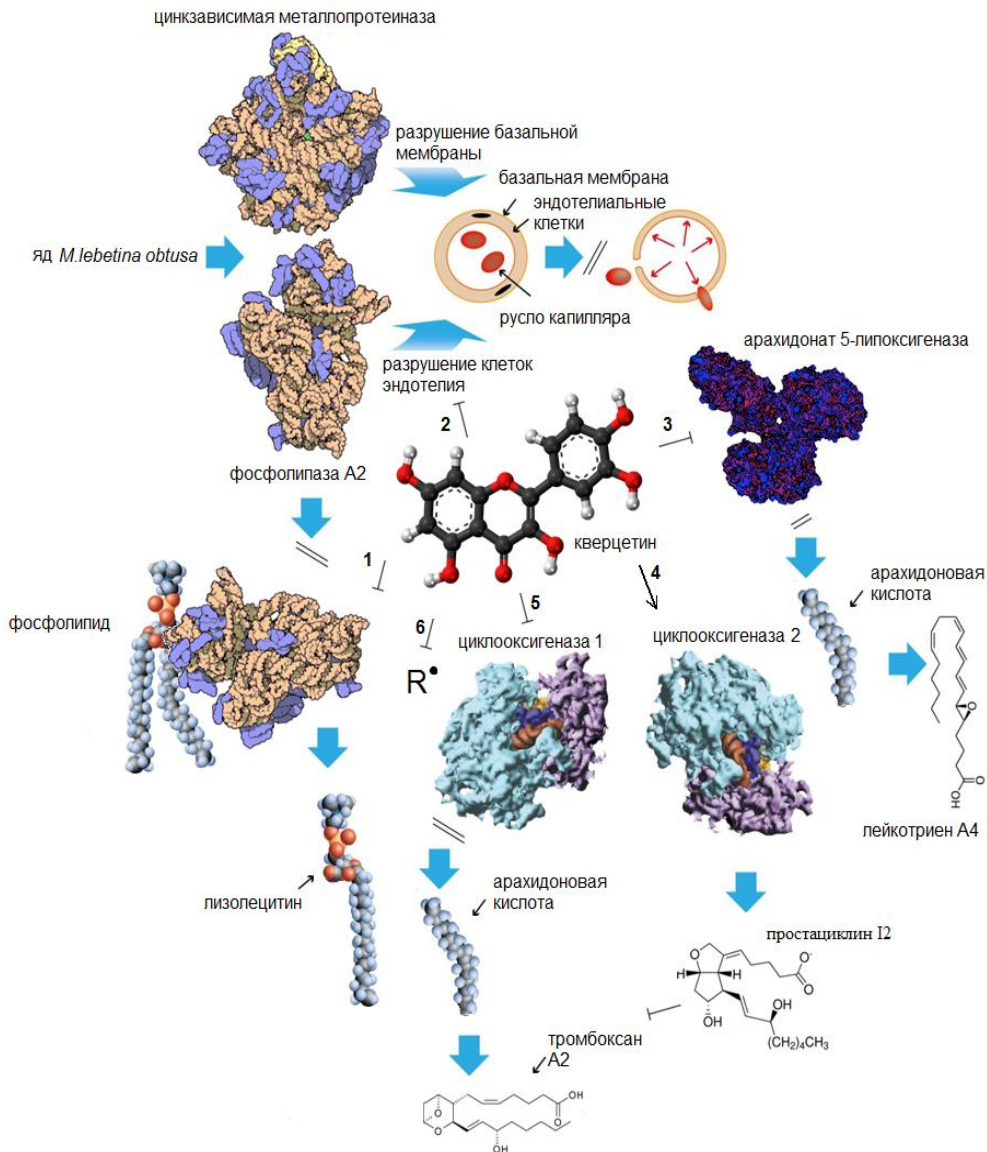


Рис. 11. Гипотетическая модель механизмов действия экстрактов *C.laevigata*, *A. absinthium*, *P. major*. С (активный компонент кверцетин).

1. Ингибирование активности sPLA2; 2. Стабилизация мембран клеток эндотелия; 3. Ингибирование активности арахидонат 5-липооксигеназы; 4. Активация циклооксигеназы–2; 5. Ингибирование активности циклооксигеназы–1; 6. Нейтрализация свободных радикалов.

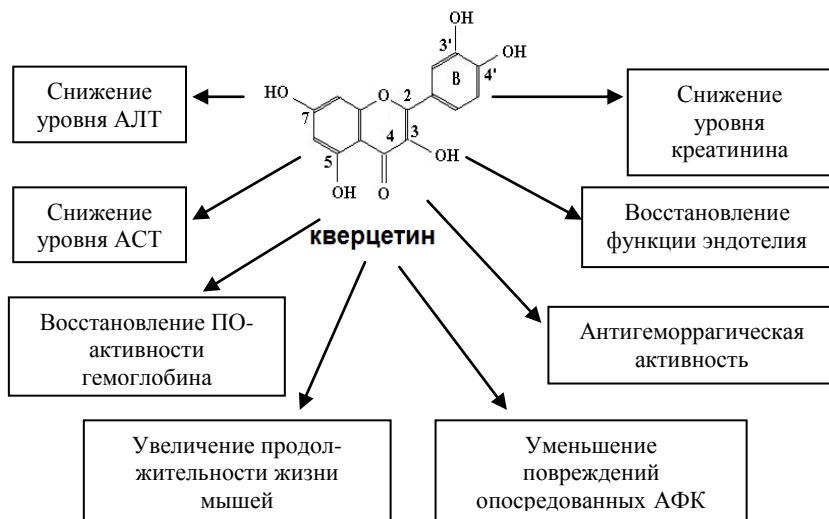


Рис. 12. Механизмы действия кверцетина.

Суммарное действие кверцетина обобщено на рисунке 12, из которого следует, что местное применение кверцетина предотвращает повреждение тканей, органов, кровеносных сосудов, эритроцитов и т.д., вызванное действием яда гюрзы. Кверцетин также играет важную роль в ангиогенезе и формировании внеклеточного матрикса.

ВЫВОДЫ

1. Все исследуемые спиртовые экстракты имеют высокую антирадикальную активность. Наибольшая радикал-ингибирующая активность выявлена в экстракте *C. laevigata*, самая низкая - в экстракте *O. basilicum*.
2. В этанольных экстрактах *P. major*, *A. absinthium*, *C. laevigata*, *L. nobilis*, *O. basilicum*, *H. perforatum* обнаружено высокое содержание флавоноидов, однако антирадикальная активность экстрактов не коррелирует с общим количеством флавоноидов в них.
3. Экстракты *C. laevigata*, *A. absinthium*, *P. major* увеличивают среднюю продолжительность жизни мышей при внутрибрюшинном введении яда *Macrovipera lebetina obtusa* в дозе 2.5ЛД₅₀
4. Выявлена положительная корреляция между антирадикальной и антитоксической активностью экстрактов *C. laevigata*, *A. absinthium*, *P. major* и количественным содержанием кверцетина в них.
5. Действие яда *Macrovipera lebetina obtusa in vitro* на эритроциты приводит к значительным изменениям спектра поглощения суспензии эритроцитов и снижению пероксидазной активности гемоглобина, однако присутствие кверцетина уменьшает воздействие яда на гемоглобин и на пероксидазную активность, в частности.
6. Кверцетин способствует снижению уровня аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы и креатинина в плазме крови крыс, но не влияет на изменения уровня фибриногена и тромбинового времени при внутрибрюшинном введении яда *Macrovipera lebetina obtusa*.
7. Кверцетин обладает выраженной антигеморрагической активностью против действия яда *Macrovipera lebetina obtusa* на сосуды головного мозга крыс.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Hovhannisyan D., Rukhkyan M., Vardapetyan H. Flavonoid content and *in vitro* antiradical activity of *Laurus nobilis* leaf extracts // Ազրնգիտություն, № 3-4 (631-632), էջ 177-181, 2011.
2. Vardapetyan H., Hovhannisyan D., Rukhkyan M., Gasparyan G. Comparative analysis of flavonoid content and *in vitro* antiradical activity of *Laurus nobilis* leaves extracts from different regions of South Caucasus // Вестник РАУ, № 2, стр. 63-66, 2011.
3. Оганесян Д., Рухкян М., Вардапетян Г. Антиоксидантная активность экстрактов некоторых видов растений // Сборник трудов годичной конференции РАУ, с. 256-261, 2011.
4. Hovhannisyan D., Rukhkyan M., Martirosyan A. Comparative analysis of *in vitro* free radical scavenging activity and total flavonoid content in Abkhazian and Armenian *Laurus nobilis* leaf extracts // Устные доклады международной научной конференции “Ломоносов”, Москва, с. 235-236, 2011.
5. Hovhannisyan D., Rukhkyan M., Gasparyan G., Zagorski K. Free radical scavenging activity, flavonoid content and antibacterial activity of some herbs grown in Armenia // Устные доклады международной научной конференции “Ломоносов”, Москва, с. 231, 2012.
6. Оганесян Д., Гаспарян Г., Вардапетян Г. Фракционирование яда гюрзы (*Macrovipera lebetina obtusa*) обитающей на территории Армении // Вестник РАУ, № 2, с. 76-79, 2013.
7. Hovhannisyan D., Gasparyan G. In vivo investigation of quercetin antitoxic activity against Armenian *M. lebetina obtusa* venom // Сборник материалов международного аспирантского форума "Современная наука: тенденции развития, проблемы и перспективы" Ереван, с. 62-64, 2013.
8. Vardapetyan H., Tiratsuyan S., Hovhannisyan A., Rukhkyan M., Hovhannisyan D. Phytochemical composition and biological activity of *Laurus nobilis* L. leaves collected from two regions of South Caucasus // Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences, v. 1, iss. 2, p. 45-51, 2013.
9. Оганесян Д. Содержание флавоноидов и антиоксидантная активность экстрактов *H. perforatum*, *P. major l.*, *A. absinthium* и *C. laevigata* // Вестник РАУ, № 1, с. 89-93, 2014.
10. Hovhannisyan D., Tiratsuyan S., Gasparyan G., Voskanyan A., Vardapetyan H. Antihemorrhagic activity of quercetin against *Macrovipera lebetina obtusa* venom // Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences, v. 2, iss. 2, p. 165-170, 2014.

Հովհաննիսյան Դավիթ Հենրիի

ՈՐՈՇ ԴԵՂԱԲՈՒՅՍԵՐԻ ԷՔՍՏՐԱԿՏՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ԿԵՆՍԱՔԻՄԻԱԿԱՆ
ՄԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐԸ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր՝ հակաօքսիդանտ, քվերցեթին, ֆլավոնոիդներ, sPLA2, *Macrozipera lebetina obtusa*-ի թույլ:

Ֆլավոնոիդները բուսական ծագման երկրորդային մետաբոլիտներ են, որոնք իրենցից ներկայացնում են ցածրամոլեկուլյային պոլիֆենոլներ: Նրանք օժտված են կենսաբանական բարձր ակտիվության լայն սպեկտրով, ցուցաբերում են իմունամոդուլացնող, հակաբորբոքային, հակաաթմատիկ, հակաուռուցքային և այլ ակտիվություններ: Ֆենոլային միացությունների ազդեցության հիմքում ընկած են նրանց հակաօքսիդանտային հատկությունները:

Ատենախոտական աշխատանքի նպատակն է եղել ուսումնասիրել մի շարք դեղաբույսերի՝ *P. major*-ի, *A. absinthium*-ի, *C. laevigata*-ի, *L. nobilis*-ի, *O. basilicum*-ի, *H. perforatum*-ի էքստրակտների հակաօքսիդանտային և հակաթունային հատկությունները, բացահայտել ակտիվ բաղադրիչները, ինչպես նաև բնորոշել նրանց ազդեցության մեխանիզմները: Կատարվել են վերը նշված բույսերի էթանոլային էքստրակտների հիմնական բաղադրիչների քանակական և որակական բարձր ազդեցության հեղուկային քրոմատոգրաֆիա (ԲԱՀՔ) վերլուծություններ; հետազոտվել են էքստրակտների և նրանց բաղադրիչների հակաթունային հատկությունները գյուրգայի *Macrozipera lebetina obtusa* թույլի դեմ հակատոքսիկ հատկությունները *in vivo* և *in vitro* փորձարարական մոդելային համակարգերում:

Ֆլավոնոիդների ամենաբարձր քանակությունը հայտնաբերվել է *L. nobilis*-ի (9.9 մգ/մլ), իսկ ամենացածրը *A. absinthium*-ի (2.1 մգ/մլ) էքստրակտի մեջ: Հետազոտված բույսերի էթանոլային էքստրակտներից ամենաբարձր հակա-ռադիկալային ակտիվությամբ օժտված է *C. laevigata*-ի էքստրակտը, իսկ ամենացածրը՝ *O. basilicum*-ը: Ստացված արդյունքների համաձայն բոլոր երեք էքստրակտները պարունակում են քվերցեթին և քվերցեթրին: Կարևորվում է այն փաստը, որ քվերցեթրինի քանակը էքստրակտներում, և նրանց հակառադիկալային և հակաթունային ակտիվությունները կորելացվում են:

in vivo փորձերի արդյունքում եկել ենք այն եզրակացության, որ ստուգիչ կենդանիների համեմատ *C. laevigata*-ի, *A. absinthium*-ի, *P. major*-ի էքստրակտների և օձի թույլի միաժամանակյա ազդեցությամբ դիտվում է փորձարարական մկների կյանքի տևողության երկարում 62%, 53%, 32%-ով, համապատասխանաբար:

Ըստ ստացված տվյալների, *Macrozipera lebetina obtusa*-ի թույլը առաջացնում է էրիթրոցիտների կախույթի սպեկտրալ հատկությունների փոփոխություններ՝ բերելով Սորեի գծի օպտիկական խտության անկման: Գյուրգայի թույլի ազդեցությամբ էրիթրոցիտների հեմոգլոբինի պերօքսադազային ակտիվությունը նվազում է 2.1 անգամ, իսկ թույլով և քվերցեթրինով ինկուբացնելիս 1.2 անգամ

ստուգիչի համեմատ: Կարելի է եզրակացնել, որ քվերցեթինը վերականգնում է հեմոգլոբինի պերօքսիդազային ակտիվությունը:

Փորձերի արդյունքներից պարզ դարձավ, որ փորձարարական առնետներին թույնի ներորովայնային ներարկման դեպքում արյան պլազմայի մեջ մեծանում է ասպարտատամինոտրանսֆերազի (AST), պլանինամինոտրանսֆերազի (ALT) և կրեատինինի քանակները 3.4, 6.1, 3.2 անգամ, համապատասխանաբար ստուգիչի նկատմամբ: Քվերցեթինի և թույնի համատեղ ներարկման դեպքում արյան պլազմայում դիտվում է AST-ի, ALT-ի, կրեատինինի քանակների նվազում 24.9%, 28.5% և 30.8%-ով, համապատասխանաբար, համեմատած միայն թույն ներարկված կենդանիների հետ: Ստացված արդյունքները վկայում են քվերցեթինի հեպատոցիտների, երիկամների և միոկարդի բջիջների պաշտպանիչ ակտիվության մասին:

Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ քվերցեթինի և թույնի համատեղ ներարկման դեպքում նվազում է թույնի հետևանքով առաջացած հեմորոզիկ վնասվածքի տարածքը 49.7%-ով: Տվյալները վկայում են այն մասին, որ քվերցեթինը ունի արտահայտված հակահեմորոզիկ ակտիվություն *Macrovipera lebetina obtusa*-ի թույնի ազդեցության նկատմամբ:

Հիմնվելով ստացված արդյունքների և համապատասխան գրական տվյալների վրա, մեր կողմից առաջարկվել է ուսումնասիրված դեղաբույսերի էքստրակտների հակաթունային ակտիվության ազդեցության հնարավոր մեխանիզմների գծապատկեր, ըստ որի քվերցեթինը ցուցաբերում է հակառադիկալային, sPLA2-ի, COX-1-ի ակտիվությունը խցանող, իսկ COX-2-ի ակտիվությունը խթանող, ինչպես նաև էնդոթելային բջիջների թաղանթների կայունացնող ազդեցություններ:

SOME MEDICAL PLANTS EXTRACTS BIOCHEMICAL MECHANISMS OF ACTION

SUMMARY

Key words: antioxidant, quercetin, flavonoids, sPLA2, *Macrovipera lebetina obtusa* venom.

Flavonoids are secondary metabolites of plant origin, representing a broad class of low molecular weight polyphenols. They have a wide spectrum of biological activities, exhibit immunomodulatory, antiinflammatory, antiasthmatic, antitumor, hepatoprotective and other activities. It is believed that the physiological action of the most phenolic compounds is based on their antioxidant properties.

The aims of our study were to investigate the antioxidant and antitoxic properties of extracts of *L. nobilis*, *O. basilicum*, *P. major* L., *A. absinthium*, *H. perforatum* and *C. laevigata*, to reveal their active compounds and to define biochemical mechanisms of their action. For these purposes, in our work we have conducted qualitative and quantitative analysis of the main components of ethanol extracts of studied plants. Antitoxic properties of extracts and their components against the effects of the viper (*Macrovipera lebetina obtusa*) (MLO) venom were investigated in a number of experimental models *in vivo* and *in vitro*.

The greatest total amount of flavonoids was found in the *L. nobilis* extract (9.9 mg/ml), and the least in the *A. absinthium* extract (2.1 mg/ml).

The *C. laevigata* extract showed the highest antiradical activity and the lowest antiradical activity was detected in the extract of *O. basilicum*.

There was detected an increase in life time of animals which were administered the venom together with extracts of *C. laevigata*, *A. absinthium*, *P. major* compared with the control group by 62%, 53 %, 32 %, respectively.

Obtained HPLC data indicate that only quercetrin and quercetin are found in all three test extracts.

It is noteworthy that the amount of quercetin in the *C. laevigata*, *A. absinthium*, *P. major* extracts is positively correlated with their antiradical and antitoxic activity, which may indicate a significant role of quercetin in antiradical and antitoxic activity of these extracts.

Our data indicate that the MLO venom causes significant changes in the spectral properties of the suspension of erythrocytes, particularly reduces the optical density of the Soret band. Additionally, the peroxidase activity of hemoglobin of erythrocytes treated by viper venom reduced 2.1 times compared to the control sample activity. While, the peroxidase activity of hemoglobin of the erythrocytes treated with venom and quercetin reduced only 1.2 times compared to the control sample activity.

The results of our study showed that one hour after the intraperitoneally injection of MLO venom a significant increase of AST, ALT and creatinine levels were detected in rat's blood plasma compared with the control group. Simultaneous administration of quercetin and viper venom showed a reduction in the level of AST, ALT and creatinine by 24.9%, 28.5% and 30.8 %, respectively, in the animals blood plasma compared with animals injected with the venom only. The obtained data shows a significant protective effect of quercetin on myocardial, renal cells and hepatocytes.

The data of histochemical analysis have shown that animal group treated by venom simultaneous with quercetin had decreased hemorrhages area by 49.7% compared to venom group.

Based on these results and the literature data we proposed a hypothetical model of the mechanisms of antitoxic effect of extracts against the MLO venom. The scheme includes the

possible mechanisms of action of quercetin, as one of the active components of the extracts, expressed as inhibition of sPLA2, the stabilizing effect of quercetin on the membrane of endothelial cells, and inhibition of COX-1 and lipoxygenase-5, stimulating activity of COX-2 and anti-radical activity.