

ности и злокачественные процессы. Следовательно, весьма значимо выявление молекулярных маркеров прогрессии этих поражений.

Целью исследования явилось изучение молекулярных маркеров, определяющих риск прогрессии эпителиальных неопластических процессов конъюнктивы.

Стандартным иммуногистохимическим методом изучены молекулярные маркеры: Ki67, PNH3, Bcl2, P53, P63 и CK7. Рассчитан плоскоклеточно-железистый индекс по оценке препаратов стандартной гематоксилин-эози-

новой окраски и соотношением P63/CK7. Результаты исследования показали, что в процессе прогрессии интраэпителиальных неоплазий конъюнктивы значительно увеличивается количество плоскоклеточного эпителия, следовательно, увеличивается плоскоклеточно-железистый индекс. По пролиферативным и апоптозным показателям возможно разделение интраэпителиальных поражений конъюнктивы на 2 группы - интраэпителиальные неоплазии низкой степени и интраэпителиальные неоплазии высокой степени.

რეზიუმე

კონიუნქტივის ეპითელიური ნეოპლაზიური პროცესების პროგრესიის მოლეკულური მარკერები

¹ნ.ნიკოლაიშვილი, ¹გ.ჩინუა, ²თ.მუხაშვილი, ²გ.ბურკაძე

¹ნიუ ვიქენ უნივერსიტეტი, თბილისი; ²თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, საქართველო

კონიუნქტივის ეპითელიური დაზიანებები მოიცავს როგორც კეთილთვისებიან, ისე გარდამავალი ავთვისებიანობის და ავთვისებიან დაზიანებებს. შესაბამისად, მნიშვნელოვანია ამ დაზიანებათა ავთვისებიანი პროგრესიის მოლეკულური მარკერების გამოვლენა.

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა კონიუნქტივის ეპითელიური ნეოპლაზიური პროცესების პროგრესიის რისკის განმსაზღვრელი მოლეკულური მარკერების შესწავლა.

სტანდარტული იმუნოჰისტოქიმიური მეთოდით გამოვლენილია შემდეგი მარკერები: Ki67, PNH3, Bcl2, P53, P63 და CK7. გამოანგარიშებულია ბრტყელუჯრედოვან-ეპითელიური ინდექსი სტანდარტული ჰემატო-

ქსილინ-ეოზინით შედგებილი ანათლების შეფასებით და P63/CK7 შეფარდებით.

კვლევის შედეგებმა აჩვენა, რომ კონიუნქტივის ინტრაეპითელიური ნეოპლაზიების პროგრესიის პროცესში მნიშვნელოვნად მატულობს ბრტყელუჯრედოვანი ეპითელიუმის შემცველობა და, შესაბამისად, ბრტყელუჯრედოვან-ჯირკვლოვანი ინდექსი. გარდა ამისა, პროლიფერაციული და აპოპტოზური მახასიათებლების მიხედვით შესაძლებელია კონიუნქტივის ინტრაეპითელიური დაზიანებების ორ ჯგუფად დაყოფა, კერძოდ, დაბალი ხარისხის ინტრაეპითელიურ ნეოპლაზიად და მაღალი ხარისხის ინტრაეპითელიურ ნეოპლაზიად.

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИНДОЛЬНЫХ АЛКАЛОИДОВ ИЗ НАДЗЕМНЫХ ОРГАНОВ VINCA ROSEA L., ИНТРОДУЦИРОВАННОЙ В ЗАПАДНОЙ ГРУЗИИ

¹Вачнадзе В.Ю., ¹Вачнадзе Н.С., ²Бакуридзе А.Дж., ³Джохадзе М.С., ¹Мшвиладзе В.Д.

Тбилисский государственный медицинский университет, ¹Институт фармакохимии им. И. Кутателадзе, ²департамент фармацевтической технологии; ³направление фармакогнозии и фармацевтической ботаники, Грузия

Среди интродуцированных в Грузию алкалоидосодержащих кустарников, полукустарников, деревьев и травянистых растений особое место занимают полукустарники видов рода *Catharanthus G.D.* Из них на побережье Черного моря Аджарии интродуцированы: *Catharanthus rosea (L.) G.D. (Vinca rosea L.)* и *Catharanthus rosea f. Albus (Sweet) G.D.*, который изучен в Институте фармакохимии им. И. Кутателадзе Тбилисского государственного медицинского университета на содержание биологически активных алкалоидов [1,2,13].

Помимо указанных видов, ранее были исследованы: *C. ovalis Mgf.*; *C. longifolius Pichon*; *C. lanceus (Bojex A.Dc.) Pichon*; *C. pussilus (Murr.)* [7,8]. *Vinca rosea*, как лекарствен-

ное растение, издавна использовалась народами Южной Африки, Италии, Австралии, Южного Вьетнама, Филиппин и Англии. Листья употреблялись в виде чая в качестве диабетического средства, а в Южной Африке и Англии имелись патентованные препараты „Covinca“ и „Vinculine“, являющиеся настоем листьев розовой винки [7,10].

Особый интерес к виду *V. rosea* вызван выделением в 1958-1959 гг. алкалоида винкалейкобластина, который после фармакологического и клинического испытаний рекомендован для лечения болезни Ходжкина и хориокарциномы как средство, вызывающее С-митотические изменения в клетках и нарушение деления клеток в метафазе [7-9]. Из того же вида, несколько позднее, выделен димерный алкало-

ид леуокристин (винкристин), который после клинического испытания, был рекомендован в качестве эффективного средства при острой лейкемии у детей и взрослых, а также при лимфогранулематозе, даже в устойчивых к винбластину случаях [11].

Известно, что основной задачей при сборе лекарственного растительного сырья для проведения фитохимических исследований является сохранение биоэкологического равновесия во флоре и сохранение способности растения к восстановлению в природе и в культуре. Исходя из указанного, целью исследований явилось выделение фракции индольных алкалоидов из надземных органов *V. rosea* способом жидкость - жидкостной экстракции; идентификация и изучение их биологической активности как потенциального источника с цитотоксической активностью; проведение необходимой идентификации растительного сырья для определения особенностей микроструктуры строения надземных органов растения.

Материал и методы. Объектами исследования были надземные органы *Vinca rosea*, собранные в фазах цветения на побережье Черного моря Аджарии. Существующие на сегодняшний день способы выделения некоторых алкалоидов из видов *Catharanthus*, основаны, преимущественно, на двухступенчатой обработке общей суммы оснований: осаждение алкалоидов петролейным эфиром и полибуферным распределением [4,5]. На стадии очистки в качестве экстрагента использованы водные растворы уксусной кислоты [5,12].

1,0 кг воздушно - сухих измельченных надземных органов *Vinca rosea* экстрагировали по методу Atta-ur-Rahmana [4]. Полученную реакционную массу сгущали до густого экстракта и обрабатывали 5% раствором соляной кислоты. Кислую фазу подщелачивали 25% NH_4OH , алкалоиды извлекали хлороформом. Хлороформные извлечения сгущали, обрабатывали 10% раствором уксусной кислоты. Объединенные кислые извлечения подщелачивали 25% NH_4OH до pH 9-10, алкалоиды исчерпывающе экстрагировали хлороформом. Объединенные хлороформные извлечения сгущали под вакуумом до сухого остатка, в результате получили растворимую в эфире сумму алкалоидов в количестве 4,0 г и тоже количество (4,0 г) в хлороформе растворимую сумму алкалоидов. Из них способами осаждения петролейным эфиром и полибуферным распределением получали фракции с выходом 0,25 г и 0,32 г, соответственно. 200 г воздушно-сухих измельченных корней обрабатывали по методу Gordon, с выходом 0,198 г эфирной фракции [6].

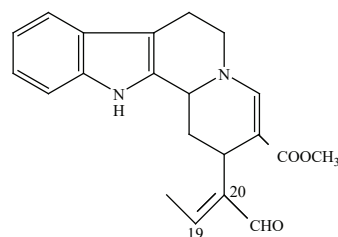
Идентификацию алкалоидов проводили методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией LS-MS/MS и газовой хроматографией с масс-спектрометрическим детектированием GC/MS на аппаратах Agilent technologies 1290 infinity 6460 Triple quad LC/MS и PerkinElmer.

Качественный анализ спектра алкалоидов во фракциях оценивали хроматографированием в тонком слое на пластинках Silicagel₂₅₄, Merck в системах: I) бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:1); II) этилацетат-абсолютный этанол (3:1). Детекторы: реактив Драгендорфа и церий амоний сернокислый (ЦАС) в 85% ортофосфорной кислоте [3,7].

Цитотоксичность субстанций мономерных алкалоидов оценена на A-549 (клетки линии рака легкого), DLD-1 (клетки линии аденокарциномы прямой кишки) и W-1 (клетки линии нормальных человеческих фибробластов). Цитотоксическая активность *in vitro* выражена как концентрация алкалоидов, препятствующих росту клеток на 50% (IC_{50}). Ли-

нии клеток получены из Американской Коллекции Типовых Культур (ATCC). Все клетки линий культивированы в минимальной поддерживающей среде, содержащей соли Эрла и L-глутанина (Mediatech Cellgro YA), к которым добавлены: 10% фетальной бычьей сыворотки (Hyclon), витамины, пенициллин (100 IU/ml) и стрептомицин (100 mg/ml), незаменимые аминокислоты и пируват натрия (Mediatech Cellgro YA). Клетки хранились при температуре 37°C во влажной среде, содержащей 5% CO_2 [13]. Исследования проводились в лаборатории LASEVE, в отделе фундаментальных наук Университета Квебека в г. Шикутине, Канада профессорами Андре Пичеттом и Жаном Лерау, за что выражаем им глубокую признательность и благодарность.

Результаты и обсуждение. В результате анализа фракций алкалоидов, полученных экстракцией уксусной кислотой, осаждением петролейным эфиром и полибуферным распределением методами LS-MS/MS и GC/MS идентифицированы 14 известных соединений, принадлежащих хромоформным системам индола, индолина, индоленина и карболина (таблица 1). Согласно экспериментальным данным, среди индольных алкалоидов доминируют производные сарпагина, среди индолинов - производные виндолина. Что касается низкомолекулярных соединений и карболинов, то чаще всего в природе они встречаются в виде продуктов распада комплексных индольных алкалоидов [7]. В анализируемых субстанциях они представлены соединениями: Norharmame, Kumujuane B. и карболинами (№1, №2) с молекулярными массами M^+226 , которые, возможно, возникли как результаты распада виндолини-на и изовиндолини-на. Хиназолиновый фрагмент с M^+202 также может быть результатом распада хиназолинкарболиновых алкалоидов, содержащих ядро карболина и хиназолина. Подобные соединения встречаются в растениях сем. Rutaceae, например: *Evodia rutaecarpa* Hook. f. Et Thomas, *Zanthoxylum rhetsa* A. DC. [7]. Среди иохимбановых алкалоидов, помимо *Tetrahydroalstonine* и *Ajmalicine*, идентифицированы производные лабильного основания *Vallesiahotamine*, выделенного из *Vallesia dichotama* [7] - это продукты восстановления альдегидной группы при C-20 до первичной спиртовой - *Vallesiahotaminol* ($\text{M}^+ 324$); C19-C20 dihydrovallesiahotamine ($\text{M}^+ 352$) и vallesiahotamine lactone ($\text{M}^+ 322$) [7].

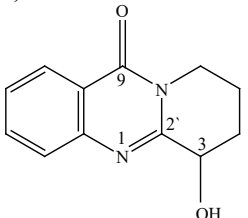
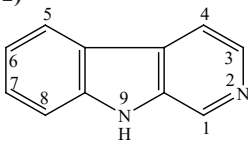
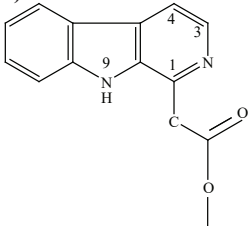
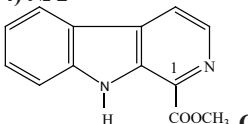


Vallesiahotamine

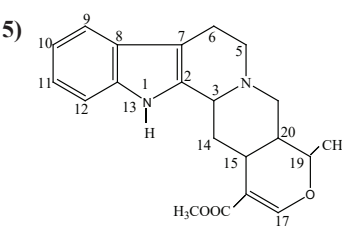
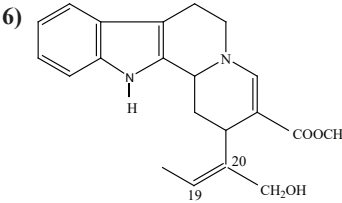
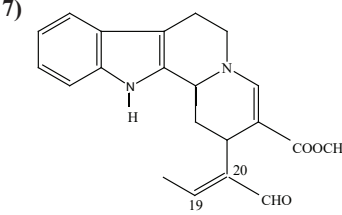
Качественный анализ алкалоидов эфирной суммы корней *V. rosea* провели методом тонкослойного хроматографирования на пластинках Silicagel₂₅₄, Merck в системе II (этилацетат-абсолютный этанол 3:1). Детекторы: реактив Драгендорфа и ЦАС) в присутствии достоверных образцов алкалоидов *Ajmalicine*, *Tetrahydroalstonine*, *Akuammicine*. Установлено, что по подвижности и по характерной реакции с реактивом ЦАС в эфирной сумме корней доминируют эти основания. Результаты исследования *in vitro* цитотоксической активности биологически активных фракций I, II, III приведены в таблице 2.

Идентифицированные алкалоиды и фрагменты:

I. Низкомолекулярные карболиновые соединения

<p>1)</p>  <p>$C_{11}H_{10}N_2O_2$</p>	<p>1H-Pyrrolo-[2,1-b]-quinazolin-9-one, 3-hydroxy-2,3-dihydro- M⁺202(100 %); m/e 185; 174; 155; 146; 130; 119; 102; 90; 76; 63; 55; 50</p>
<p>2)</p>  <p>$C_{11}H_8N_2$</p>	<p>9H-Pyrido[3,4-b]indole M⁺168(100 %); m/e 153; 140; 128; 114; 101; 84; 70; 63; 50 синоним: α-carboline; Norharmane</p>
<p>3) № 1</p>  <p>$C_{13}H_{10}N_2O_2$</p>	<p>9H-Pyrido[3,4-b]indole-1 carboxylic acid, methyl ester M⁺226; m/e 194; 166(100 %); 140; 114; 83 (I). синоним: Kumuiane B</p>
<p>4) № 2</p>  <p>$C_{13}H_{10}N_2O_2$</p>	<p>1 – carbomethoxy – β - carboline M⁺226; m/e 197; 184; 170; 169 (100 %); 156 (II).</p>

II. Алкалоиды с хромофорной системой индола, индолина, метилиндолина

<p>5)</p>  <p>$C_{21}H_{24}N_2O_3$</p>	<p>16 – carbomethoxy – 19 – methyl-yohimbane M⁺352; m/e 184; 170; 169(100 %); 156. синоним: tetrahydroalstonine</p>
<p>6)</p>  <p>$C_{21}H_{22}N_2O_3$</p>	<p>C20 – dihydrovallesiahotaminole M⁺324; m/e 323 (M-1, 100 %); 184; 170; 169; 156.</p>
<p>7)</p>  <p>$C_{21}H_{24}N_2O_3$</p>	<p>C₁₉-C₂₀ dihydrovallesiahotamine M⁺ 352; m/e 294; 281; 263; 184; 169; 156.</p>

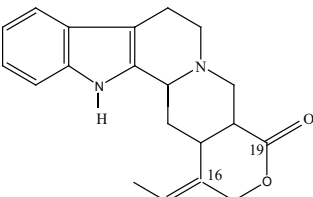
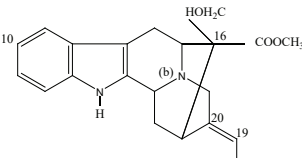
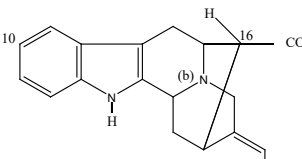
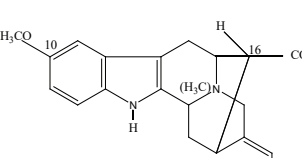
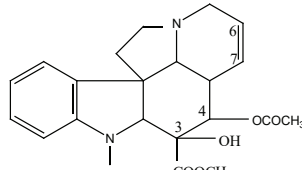
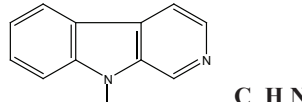
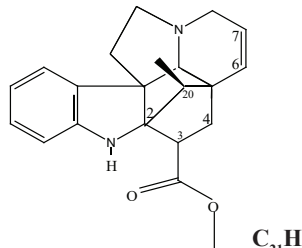
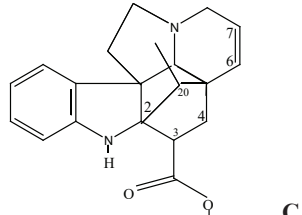
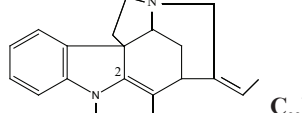
<p>8)</p>  <p>$C_{20}H_{22}N_2O_2$</p>	<p>Оxayochimbane -19 – one – 16 – ethylidene M^+322(100 %); m/e 277; 249; 221; 184; 169; 156; 115. синоним: vallesiahotamine lactone.</p>
<p>9)</p>  <p>$C_{21}H_{24}N_2O_3$</p>	<p>16 – carbomethoxy – 16 epi – 10 deoxy -sarpagine M^+ 352; m/e 294; 275; 261; 249; 170; 169; 168. синоним: polyneuridine</p>
<p>10)</p>  <p>$C_{20}H_{22}N_2O_2$</p>	<p>16 – carbomethoxy – normacusine B M^+ 322(100 %); m/e 321; 307; 263; 249; 169 (97%); 168; 154. синоним: pericyclivine</p>
<p>11)</p>  <p>$C_{21}H_{27}N_2O_2^+$</p>	<p>10-O-Methyl - N_b -metholochnerine M^+ 339; m/e 307; 281; 249; 169; 157. синоним: lochnerame</p>
<p>12)</p>  <p>$C_{24}H_{30}N_2O_5$</p>	<p>Δ^6- 4β- acetoxy-3α-carbomethoxy -3β hydroxy – Nα methyl- 6,7 didehydro M^+ 426; m/e 279; 278; 265; 174; 135(100 %). синоним: vindorosine</p>
<p>14)</p>  <p>$C_{11}H_8N_2$</p>	<p>α-carboline M^+ 168 (100%); m/e 153; 140; 128; 114; 84; 70; 50.</p>
<p>16)</p>  <p>$C_{21}H_{24}N_2O_2$</p>	<p>2,20-cycloaspidospermidine-3-epi-carboxylic acid-6,7- didehydro, methyl ester M^+336; m/e 321; 305; 277; 247; 230; 183; 170; 156; 134(100 %); 120; 91. Синонимы: 3-epi-vindolinine, isovindolinine</p>
<p>17)</p>  <p>$C_{21}H_{24}N_2O_2$</p>	<p>2,20-cycloaspidospermidine-3-carboxylic acid-6,7- didehydro, methyl ester M^+ 336; m/e 321; 305; 277; 249; 230; 216; 180; 170; 156; 135(100%); 107; 93. синоним: vindolinine</p>
<p>18)</p>  <p>$C_{22}H_{22}N_2O_2$</p>	<p>2- methylene-16-carbomethoxy-indoline M^+ 322 (31%); m/e 307; 263; 221; 207; 180; 121 (51%) синоним: acuammicine</p>

Таблица 1. Содержание алкалоидов во фракциях I, II, III, IV

№	Фракция	Алкалоиды	Хромофорная система алкалоида
I	петролейный эфир (надземная часть)	Vindoline Isovindoline Фрагмент M ⁺ 202	индолин индолин хиназолин
II	РН-3,0 (надземная часть)	Norharmine Lohneram	индол индол
III	10% уксусная кислота (надземная часть)	Фрагмент I- M ⁺ 226 Фрагмент II- M ⁺ 226 Norharmine Tetragidroalstonine Vallesiahotaminole C19-C20 dihydrovallesiahotamine Vallesiahotamine lacton Lohneram Polyneuridine Pericyclivine Vidorosine Vindoline Isovindoline Akuammicine	индол индол индол индол индол индол индол индол индол индолин индолин индолин метилениндолин
IV	Эфирная сумма (корни)	Ajmalicine Tetragidroalstonine Akuammicine	индол индол метилениндолин

Таблица 2. In vitro цитотоксическая активность алкалоидов *V. rosea*

№	Фракция	Вегетив- ный орган	Линии клеток					
			Resazurine			Hoechs		
			A-549 mg/ml	DLD-1 mg/ml	WS-1 mg/ml	A-549 mg/ml	DLD-1 mg/ml	WS-1 mg/mlcy
1	Петролейный эфир (I)	надземная часть	<1.563	< 1.563	8±3	< 1.563	< 1.563	7±3
2	Эфирная сумма (II)	корни	3,7±0,2	3,8±0,4	11±2	1,6±0,4	2±0,4	7±2
	Etaposite		2.3±0.2µm	2.8±0.4 µm	19±3 µm	0.45±0.09µm	0.6±0.2 µm	19±7 µm
3	Экстракт 10% уксусной кислоты (III)	надземная часть	4,6±0,2	3,57±0,08	2,3±0,1	0,45±0,4	2,7±0,1	2±0,2
	Etaposite	-	-	-	-	1,5±0.1µm	3,0±0.3 µm	3,1±0,5µm

Согласно *in vitro* исследованиям, субстанции I, II, III проявили выраженную цитотоксическую активность: наиболее сильную активность проявила фракция петролейного эфира (I), что касается показателей эфирной суммы корней (II) и 10% уксусной кислоты из надземных органов *Vinca rosea* (III), то с некоторой избирательностью действия на линии клеток, активности обеих субстанций практически идентичны. В результате идентификации мономерных алкалоидов установлено, что во фракции 10% уксусной кислоты РН-3,0 и 10% уксусной кислоты эфирной суммы корней доминантными являются основания с хромоформной системой индола, фракция петролейного эфира обогащена производными индолина.

ЛИТЕРАТУРА

- ვანნაძე ვ., ჯაყელი ე., მუჯირი მ., ბუმიტაიშვილი ლ., ჩხიკვაძე გ., კინწურაშვილი ლ., სულაძე თ., ვანნაძე ნ. საქართველოში მოზარდი და ინტროდუცირებული მცენარეების შესწავლა ალკალოიდების შემცველობაზე. თსსუ, შრომათა კრებული, 2012, XVI, 13.
- Вачнадзе Н.С., Кинцурашвили Л.Г., Суладзе Т.Ш., Бакурдзе А.ДЖ., Вачнадзе В.Ю. Алкалоиды интодучированной в Западной Грузии *Vinca rosae* L. Georgian Medical News, 2013, 11(224), 85-87.
- Государственная фармакопея М. изд. Медицина, XI(1), 1987, 334; XI(2), 1990, 398.

4. Atta-ur-Rahman, Bashir M., Hafeez M., Derpeen N., Fatima F. and Misky A.N. A rapid procedure for the isolation of cataranthine, vindoline and vinblastine. *Journal of Planta medica*. 1983, 47, 246-247.
5. Elias R., Oliver E., Baghalikian B. *Medical plants: innovative process of extraction*. 3th international sciences, may 29-31, Tbilisi, Georgia, 2015, 10-11.
6. Gordon H. Svoboda. *The methodology of selective extraction and gradient ph extraction*. *Lloydia*, 1964, 27,4, 299-301.
7. Manske R.H.F. *The alkaloids chemistry and physiology*. New York, London. Academic Press, XX, 1981, 341.
8. Almagro, L., Fernández-Pérez, F., & Pedreño, M. (2015). Indole Alkaloids from *Catharanthus roseus*: Bioproduction and Their Effect on Human Health. *Molecules*, 2015 20(2), 2973–3000.
9. Телетаев Г.М., Семиглазова Т.Ю., Жабина А.С., Лалипова Д.Х., Клименко В.В., Котова З.С., Семенова А.И., Проценко С.А., Семиглазов В.В. Пероральные формы цитостатиков в лечении метастатического рака молочной железы. *Медицинский совет*. 2016, 10, 74-83.
10. Timothy Omara et al. *Medicinal plants used in traditional management of cancer in Uganda: a review of ethnobotanical surveys, phytochemistry, and anticancer studies*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 1-26
11. Mirjam E. van de Velde, Gertjan L. Kaspers a,b, Floor C.H. Abbink, Abraham J. Wilhelm, Johannes C.F. Ket d, Marleen H. van den Berga. Vincristine-induced peripheral neuropathy in children with cancer: A systematic review *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2017, 114-130.
12. Vachnadze V., Bakuridze A., Vachnadze N., Kintsurashvili L., Suladze T. Technological process of liquid-liquid extraction of indol group alkaloids. *International scientific conference, Urci, Georgia*, 2016, 94.
13. Vachnadze V., Vachnadze N., Kintsurashvili L., Suladze T., Mshvildadze V., Mchedlidze K. Same alkaloid – containing plants grown and introduced in Georgia and their biological activities. *Experimental and Clinical medicine*, 2017, 3, 31-36.

SUMMARY

STUDY OF THE CYTOTOXIC ACTIVITY OF INDOLE ALKALOIDS FROM THE ABOVEGROUND ORGANS OF *VINCA ROSEA L.* INTRODUCED IN WESTERN GEORGIA

¹Vachnadze V., ¹Vachnadze N., ²Bakuridze A., ³Jokhadze M., ¹Mshvildadze V.

Tbilisi State Medical University, ¹Institute of Pharmacochimistry. Kutateladze, ²Department of Pharmaceutical Technology, ³Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Georgia

The objects of this research were the aboveground and underground parts of *Vinca rosea L.*, a species of periwinkle introduced in Western Georgia. The sum of alkaloids and biologically active fractions of monomeric alkaloids were obtained by liquid-liquid extraction, precipitation with petroleum ether (I), polybuffer distribution (II) and 10% acetic acid (III). 14 known compounds were identified by LC-MS/MS and GC/MS: Low molecular weight compounds (M⁺226, M⁺202, №1,2, M⁺168) and alkaloids Ajmalicine, Tetragidroalstonine, C20-dihydrovallesiahotamine, C19-C20 Vallesiahotaminole, Vallesiahotamine

lacton, Polyneuridine, Pericy clivine, Lochnerame, Norharmane, Vidrosine, Vindolinine, Isovindolinine, Akuammicine. The cytotoxicity of monomeric alkaloids was evaluated for A-549 (cells of the lung cancer line), DLD-1 (cells of the rectal adenocarcinoma line) and W-1 (cells of the normal human fibroblast line). All three substances (I, II, III) showed pronounced cytotoxic activity.

Keywords: alkaloid, monomeric alkaloids, cytotoxic activity, *Vinca rosea L.*

РЕЗЮМЕ

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИНДОЛЬНЫХ АЛКАЛОИДОВ ИЗ НАДЗЕМНЫХ ОРГАНОВ *VINCA ROSEA L.*, ИНТРОДУЦИРОВАННОЙ В ЗАПАДНОЙ ГРУЗИИ

¹Вачнадзе В.Ю., ¹Вачнадзе Н.С., ²Бакуридзе А.Дж., ³Джохадзе М.С., ¹Мшвильдадзе В.Д.

Тбилисский государственный медицинский университет, ¹Институт фармакохимии им. И. Кутателадзе, ²департамент фармацевтической технологии, ³направление фармакогнозии и фармацевтической ботаники, Грузия

Объектами исследования являлись надземные и подземные органы *Vinca rosea L.*, интродуцированной в Западной Грузии. Сумму алкалоидов и биологически активные фракции мономерных алкалоидов получали способом жидкость-жидкостной экстракцией, осаждением петролейным эфиром (I), полибуферным распределением (II) и 10% уксусной кислотой (III). Методами LC-MS/MS и GC/MS идентифицированы 14 известных соединений: низкомолекулярные (M⁺226, M⁺202, №1,2, M⁺168) и алкалоиды Ajmalicine, Tetragidroalstonine, C20-dihydrovallesiahotamine, C19-C20 Vallesiahotaminole, Vallesiahotamine lacton, Polyneuridine, Pericyclivine, Lochnerame, Norharmane, Vidrosine, Vindolinine, Isovindolinine, Akuammicine. Цитотоксичность субстанций мономерных алкалоидов оценена на A-549 (клетки линии рака легкого), DLD-1 (клетки линии аденокарциномы прямой кишки) и W-1 (клетки линии нормальных человеческих фибробластов). Все три субстанции (I, II, III) проявили выраженную цитотоксическую активность.

რეზიუმე

დასავლეთ საქართველოში ინტროდუცირებული *Vinca rosea L.* მიწის ზედა ორგანოებიდან გამოყოფილი ინდოლის ჯგუფის ალკალოიდების ციტოტოქსიკური აქტივობის შესწავლა

¹ვ. ვაჩნაძე, ¹ნ. ვაჩნაძე, ²ა. ბაკურიძე, ³მ. ჯოხაძე, ¹ვ. მშვილდაძე

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, ¹ი. ქუთათელაძის სახ. ფარმაკოქიმიის ინსტიტუტი, ²ფარმაცევტული ტექნოლოგიის დეპარტამენტი, ³ფარმაკოგნოზიისა და ფარმაცევტული ბოტანიკის მიმართულება, საქართველო

კვლევის ობიექტის წარმოდგენდა ინტროდუცირებული დასავლეთ საქართველოში *Vinca rosea L.* მიწის ზედა და მიწის ქვეშა ორგანოები. ბიოლოგიურად

აქტიური მონომერული ალკალოიდების ფრაქციების გამოყოფისათვის გამოყენებული იყო სითხე - სითხოვანი ექსტრაქცია, დაღეჟვა პეტროლეინის ეთერით (I), პოლიბუფერული დაყოფის ხერხი (II) და 10% ძმარმეჟავას ექსტრაქცია (III). LC-MS/MS და GC/MS მეთოდებით იდენტიფიცირებულია 14 ცნობილი შენაერთი: დაბალმოლეკულური (M+226, M+202, №1,2, M+168) და ალკალოიდები: *Ajmalicine, Tetragidroalstonine, C20-dihydrovallesiahotamine, C19-C20 Vallesiahotaminole, Val-*

lesiahota mine lacton, Polyneuridine, Pericyclivine, Lochnerame, Norharmane, Vidorosine, Vindolinine, Isovindolinine, Akuammicine. მონომერული ალკალოიდების ციტოტოქსიკურობა შეფასდა A-549 (ფილტვის კიბოს საზოგადოებრივი უჯრედები), DLD-1 (სწორი ნაწლავის ადენოკარცინომის საზოგადოებრივი უჯრედები) და W-1 (ადამიანის ნორმალური ფიბრობლასტების საზოგადოებრივი უჯრედები). სამივე (I, II, III) სუბსტანცია ამჟღავნებს მკვეთრად გამოხატულ ციტოტოქსიკურ აქტივობას.

THE EFFECT OF HIGH INTENSITY WHITE NOISE ON THE ULTRASTRUCTURE OF AXO-DENDRITIC SYNAPSES IN COLLICULUS INFERIOR OF ADULT MALE CATS. QUANTITATIVE ELECTRON MICROSCOPIC STUDY

¹Gogokhia N., ^{1,2}Pochkhidze N., ²Japaridze N., ²Bikashvili T., ^{1,2}Zhvania M.

¹Ilia State University, Tbilisi, Georgia. ²Ivane Beritashvili Center of Experimental Biomedicine, Tbilisi, Georgia

Every day, people are exposed to various types of undesirable or harmful sounds created by various sources, including transport, household machines, recreational or industrial activities [1,2]. Chronic loud noise is known to produce numerous adverse effects on different levels of the organism. In addition to behavioral changes, the involvement of different auditory and non-auditory regions of the brain were described. Thus, structural and molecular modifications in subcortical auditory structures, and some “non-auditory” regions (the hippocampus, cerebellum, reticular formation, amygdala nuclei, others), involved in the processing of auditory information were detected [3-5]. The analysis of such modifications revealed that as a result of chronic noise exposure the alterations in neurotransmission take place. Therefore, of special interest should be the elucidation of the effects of chronic noise on the fine structure of synapses. Earlier, we show that high intensity white noise provokes ultrastructural alterations in porosome complex of auditory regions of cat brain [6]. Porosomes are the universal neurotransmitter-release or secretory machinery in cell plasma membrane – special site, where synaptic vesicles transiently dock to expel their content [7,8]. Each type of secretory cell porosome is characterized with specific shape and size, which is dictated by vesicle unique content, speed of release and volume of content. In neurons (fast secretory cells) porosome range in size from 10 to 20 nm, where 35-50 nm synaptic vesicles are found to dock [6,9,10]. Neuronal porosome has central plug - unique structure, atypical gatekeeper during neurotransmission, which is absent in other types of secretory cells. Using atomic force microscopy, electron microscopy, solution X-ray, 3D contour mapping and some other modern approaches, three conformational states of porosome plug – fully pushed outward, halfway retracted and completely retracted into porosome cup has been described [8,11]. The process of neurotransmission closely depends from such positions of central plug. Describing ultrastructural changes in porosome complex as a result of noise, we have found modifications in

the position of porosome plug also. Such data indicate that the alterations in neurotransmission provoked by white noise may be reflected on the finest structural level of synapses.

In the present study, we continue our experimental electron microscopic studies of the effects of loud noise on fine morphology of the brain. In particular, we describe the consequences of high intensity prolonged noise on the morphology of axo-dendritic synapses, and size and diameter of synaptic vesicles in such types of synapses of adult male cats. We are focused on subcortical auditory area – a central part of inferior colliculus, the region of midbrain, which performs one of the key roles in auditory signal integration, frequency recognition, pitch discrimination. In addition, this region is actively involved in transfer of auditory sensory signals to and from the superior colliculus [12,13].

Material and methods. *Animals and Noise exposure.* Adult male cats (14-16 months old) were used. The animals were housed 1/cage, in a wire cages (38 × 30 × 25 cm) that ensured acoustic transparency. The room was well controlled (a light/dark cycle of 12:12 h; the temperature – 20°C – 22°C, humidity – 55-60%). The animals had free access to food and water. Experimental animals were exposed to 100 dB (5-20 kHz) white noise in their home cage for one hour per day, for 10 consecutive days. The noise was provided by two Paradigm Signature S1 P- Be loudspeakers (Paradigm Electronics Inc., Canada), which were mounted 55 cm above the floor of the cages. The same approach was used in our early studies performed on rats [14,15]. Sound levels were constantly monitored using the microphone, suspended in a line 45 cm above the cage. On the next day after the last noise exposure the brains for electron microscopy were taken. Control animals were not exposed to noise. The animal maintenance and other procedures were conducted in accordance with European Union Directive on the protection of animals used for scientific research (Regulation (EU)2019/1010, adopted by the European Parliament, on 5 June 2019). The Committee of Animal Care at Ivane Beritashvili Center of Ex-