

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
ԱԿԱԴ. Լ.Ա. ՕՐԲԵԼՈՒ ԱՆՎԱՆ ՖԻԶԻՈԼՈԳԻԱՅԻ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ ՄԿՐՏԻՉ ԳԱԳԻԿԻ

ՍՈՒԼՖՈԱՄԻՆՈԹՅՈՒՆԻ ՏԱՌԻՐԻՆԻ ՀԱԿԱՆՈՑԻՑԵՊՏԻՎ ԷՖԵԿՏԸ ԿՈՎԿԱՍՅԱՆ
ԳՅՈՒՐԶԱՅԻ ԹՈՒՅՆԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՊԱՐԱԳԱՅՈՒՄ

Գ.00.09 – «Մարդու և կենդանիների ֆիզիոլոգիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

Ս Ե Ղ Մ Ա Գ Ի Դ

ԵՐԵՎԱՆ 2015

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ ИМЕНИ АКАД. Л.А. ОРБЕЛИ

ОГАННИСЯН МКРТЫЧ ГАГИКОВИЧ

АНТИНОЦИЦЕПТИВНЫЙ ЭФФЕКТ СУЛЬФОАМИНОКИСЛОТЫ ТАУРИНА ПРИ
ДЕЙСТВИИ ЯДА КАВКАЗСКОЙ ГЮРЗЫ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.09 – Физиология человека и животных

ЕРЕВАН 2015

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվ. Ֆիզիոլոգիայի
ինստիտուտի գիտական խորհրդում:

Գիտական ղեկավար՝ կ.գ.թ., դոցենտ Ա.Վ. Ոսկանյան


Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ Բ.Գ.Պ., պրոֆեսոր Է.Ս. Սեկոյան
կ.գ.դ. Վ.Ա. Չավուշյան-Պապյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԿԳՆ Երևանի Մխիթար Հերացու անվան
Պետական Բժշկական Համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2015թ. հունիսի 10-ին, ժամը
14⁰⁰ -ին, ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան Ֆիզիոլոգիայի Ինստիտուտում, Ֆիզիոլոգիայի
023 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0028, Երևան, Օրբելի եղբ. փող. 22):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան Ֆիզիոլոգիայի
ինստիտուտի գրադարանում և www.physiol.sci.am կայքում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքվել է 2015թ. հունիսի 10-ին:

023 Մասնագիտական խորհրդի
գիտական քարտուղար, կենս. գիտ. թեկնածու  Ն.Է. Թադևոսյան

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета Института физиологии им. акад.
Л.А. Орбели НАН РА.

Научный руководитель: к.б.н. доцент А.В. Восканян

Официальные оппоненты: д.м.н., профессор Э.С. Секоян
д.б.н. В.А. Чавушян-Папаян


Ведущая организация: Ереванский Государственный Медицинский
Университет имени Мхитара Гераци

Защита диссертации состоится 10-го июля 2015г., в 14⁰⁰ часов на заседании
специализированного совета 023 по Физиологии, в Институте физиологии им. акад. Л.А.
Орбели НАН РА (0028, Ереван, ул. Бр. Орбели 22).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии им. акад. Л.А.
Орбели НАН РА и на сайте www.physiol.sci.am.

Автореферат диссертации разослан 10-го июня 2015г.

Ученый секретарь специализированного совета 023
кандидат биологических наук,

 Н.Э. Тадевосян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Исследования в области выявления веществ с антиноцицептивными свойствами и разработка анальгетических препаратов на их основе являются одной из актуальных проблем современной науки. Боль, согласно Международной Ассоциации по Изучению боли, определяется, как «неприятное сенсорное и эмоциональное переживание, связанное с непосредственным или потенциально возможным повреждающим внешним воздействием» (Merskey, 1979, Merskey, 2007). Исследования показали, что приблизительно 20% взрослого населения земного шара страдает той или иной формой хронической боли, что значительно ухудшает как качество жизни, так и продуктивную деятельность (Goldberg and McGee, 2011). Наряду со многими другими повреждающими факторами, боль может быть причинена также при укусе змей самых различных видов, при этом воздействие яда приводит не только к токсическому поражению организма и отдельных органов, но также и вызывает сильнейшую болевую симптоматику в пораженной области.

Яды змей являются сложными смесями белков (как с ферментными, так и неферментными свойствами) и пептидов, составляющих 90-95 % сухого веса яда, а так же других минорных компонентов (углеводы, липиды, свободные аминокислоты, нуклеозиды, амины, катионы металлов). Предназначенные для умерщвления и переваривания жертвы, они поражают многие органы и системы организма (Lee and Albuquerque, 1979). Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) признала укусы змей важной проблемой общественного здравоохранения в сельских районах тропических и субтропических стран, расположенных в Азии, Африке, Океании и Латинской Америке. По данным ВОЗ, глобальная заболеваемость от отравления и смертность после укусов змей варьирует от 421 000 до 1841000 и от 20000 до 94000, соответственно (Kasturiratne et al., 2008). Помимо повреждающих эффектов на организм жертвы, яды животных модулируют ноцицептивные процессы (передачу болевой информации). Одним из ранних признаков укусов является нарушение болевой чувствительности. Известно, что укусы представителей семейства гадюковых вызывают интенсивные болевые ощущения, связанные с протекающими воспалительными процессами (Gutiérrez et al., 2009, Teixeira et al., 1994, Zychar et al., 2010). Основными компонентами яда, приводящими к столь выраженным локальным и системным эффектам, являются металлопротеиназы, сериновые протеазы и фосфолипаза A2 (Gutiérrez and Rucavado, 2000, Sanz et al., 2008, Zychar et al., 2010). Действие ядов гадюковых и их отдельных компонентов приводит к повышению локального и системного уровней таких провоспалительных цитокинов, как фактор некроза опухолей- α , интерлейкина-1 β , интерлейкина-6 (обладает так же противовоспалительными свойствами), интерлейкина-8 и противовоспалительного интерлейкина-10 (Avila-Agüero et al., 2001, Chacur et al., 2004, Rucavado et al., 2002, Santhosh et al., 2013, Setubal et al., 2013).

В Армении, одним из распространенных видов гадюковых является гюрза кавказская – *Macrovipera lebetina obtusa* (Arakelyan et al., 2011). Согласно литературным данным, укусы, например подвида *Macrovipera lebetina lebetina*, сопровождаются сильным отеком, геморрагиями, воспалительной реакцией и болью (Göçmen et al., 2006).

На сегодняшний день наиболее эффективными анальгетическими препаратами в медицинской практике для лечения боли являются широко известные анальгетики опиоидного ряда (такие, как морфин, кодеин и т.д.). Однако, несмотря на эффективность, они обладают сильными побочными и нежелательными для пациента воздействиями (привыкание, зависимость, тошнота, рвота и т.д.) (Benyamin et al., 2008). Лечение воспалительных состояний осуществляется при помощи противовоспалительных препаратов стероидного и нестероидного происхождения, которые также имеют неблагоприятные эффекты на организм пациента (желудочно-кишечные, сердечно-сосудистые осложнения) (Narirforoosh et al., 2013). Антисывороточная терапия также может способствовать снижению болевых ощущений

вызванных укусами змей, однако имеется риск развития сильнейшей аллергической реакции, вплоть до анафилактического шока и смерти (Picolo et al., 2002, Stone et al., 2013). Поэтому, одной из важнейших и актуальных задач современной науки и медицины является разработка и внедрение в практику анальгетических и противовоспалительных препаратов с меньшими побочными эффектами и рисками для здоровья человека.

Антиноцицептивные свойства могут проявлять не только указанные выше известные анальгетики, но и ряд физиологически активных веществ, участвующих в метаболизме соединений, сопряженных с физиологическими процессами, реализующими восприятие повреждающих факторов и передачу ноцицептивной информации. К такому типу физиологически активных веществ относится серосодержащая свободная ахиральная аминокислота таурин. Таурин является одной из аминокислот в организме человека, которая имеет множество физиологических функций и не имеет токсических эффектов при экзогенном применении даже в относительно больших дозах (Azuma et al., 1985, Jacobsen and Smith, 1968, Obinata et al., 1996). Известны также антиноцицептивные свойства таурина на моделях формалиновой и укусной боли (Silva et al., 1993). Экзогенный таурин уменьшает отек и достоверно снижает уровень 17 цитокинов воспаления (IL-1 α , β ; IL4-6; IL10; TNF- α и т.д.) на модели травматического повреждения головного мозга крыс (Su et al., 2014). Исходя из сказанного, следует, что изучение антиноцицептивных и противовоспалительных свойств таурина против действия животных ядов, и в частности яда кавказской гюрзы, является актуальной областью исследований при разработке прототипов анальгетических препаратов для купирования боли при укусах змей. Немаловажный интерес представляют также класс веществ, называемых N-ацил амидами – конъюгаты жирных кислот с физиологически активными веществами (аминокислоты, нейромедиаторы), куда входят и конъюгаты таурина. Считается, что N-ацил амиды являются регуляторами боли и воспаления в организме (Di Marzo et al., 2007).

Цель и задачи исследования. Целью данного исследования было изучение механизмов антиноцицептивного и противовоспалительного эффекта аминокислоты таурина при действии яда гюрзы кавказской.

Исходя из цели исследования, были поставлены следующие задачи:

1. Выбрать наиболее адекватный метод для изучения ноцицептивных характеристик животных ядов.
2. Провести сравнительный анализ ноцицептивного воздействия яда гюрзы кавказской с ядами некоторых представителей семейства гадюковых (гадюка Рассела, гадюка армянская) и членистоногих (скорпион пестрый, пчела медоносная).
3. Исследовать роль фосфолипазы A2 и протеаз яда гюрзы кавказской в индукции ноцицептивного поведения.
4. Провести сравнительное исследование антиноцицептивных свойств таурина при действии яда гюрзы кавказской, скорпиона пестрого и формалина.
5. Провести сравнительное исследование антиноцицептивных эффектов таурина, диклофенака, дексаметазона и анальгина при действии яда гюрзы.
6. Измерить концентрацию провоспалительных цитокинов в сыворотке крови крыс при воздействии яда гюрзы и медиации таурином.
7. Провести исследование антиноцицептивных свойств метаболитов таурина (N-ацил амидов), для проверки гипотезы их образования и анальгетического эффекта при сочетанном действии фосфолипазы A2 яда и экзогенного таурина *in vivo*.

Научная новизна. В данной работе впервые проведены исследования болевого воздействия ядов гюрзы кавказской (*Macrovipera lebetina obtusa*, MLO), гадюки армянской (*Montivipera raddei raddei*, MRR), гадюки Расселла (*Vipera russelli russelli*, VRR) и скорпиона пестрого (*Buthus eupeus*, BE) методом регистрации ноцицептивного поведения, вызванного подкожным введением яда в заднюю лапку мышей.

Впервые показано, что ингибирование фосфолипазы А2 приводит к значительному снижению ноцицептивного действия яда гюрзы кавказской. Показано также, что ингибирование фосфолипазы А2 значительно снижает и токсичность яда. Выяснена роль протеаз яда в модуляции термальной чувствительности мышей при подкожном введении яда гюрзы кавказской.

Впервые показан антиноцицептивный эффект аминокислоты таурина при действии яда гюрзы кавказской. Впервые исследованы антиноцицептивные свойства некоторых широко известных противовоспалительных препаратов: дексаметазона, диклофенака и анальгина, а также яда кобры среднеазиатской (*Naja naja oxiana*, NOX) при действии яда гюрзы.

Впервые определены концентрации провоспалительных цитокинов при действии яда гюрзы кавказской и при медикации экзогенным таурином.

Впервые исследованы антиноцицептивные свойства конъюгатов таурина с жирными кислотами, N-арахидоноил таурина и N-олеоил таурина, против действия яда гюрзы кавказской и на модели формалиновой боли. Также были впервые протестированы антиноцицептивные свойства таких эндогенных N-ацил амидов, как эндоканабиноиды/эндованилоиды N-арахидоноил этаноламин (Анандамид), N-арахидоноил допамин и синтетические амиды жирных кислот N-арахидоноил серотонин и N-арахидоноил ванилин (Арванил) на моделях боли при действии яда гюрзы кавказской. Впервые показаны антиноцицептивные свойства N-арахидоноил допамина на модели формалиновой боли.

Научно-практическая значимость работы. С точки зрения практического значения, результаты настоящих исследований позволяют рекомендовать таурин в качестве основного действующего компонента для разработки обезболивающего и противовоспалительного препарата против укусов гюрзы кавказской. Перспективно также применение некоторых N-ацил амидов, в частности Арванила, для купирования болезненных симптомов при укусах гюрзы кавказской. Использование сочетания яда кобры с таурином может быть перспективным направлением для разработки и производства высокоэффективного анальгетического препарата. Модель боли, вызванной действием яда гюрзы, может быть использована в качестве дополнительного инструмента по изучению ноцицептивных процессов в организме.

Апробация работы. Основные результаты данной работы были доложены на семинарах молодых ученых, в журнальном кружке Института физиологии им. акад. Л.А. Орбели НАН РА, на международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2013» (8-12 апреля, 2013 г., Москва, Россия), на третьей юбилейной международной конференции нейронауки и биологической психиатрии (22-24 сентября, 2013 г., Ереван, Армения), на международном аспирантском форуме «Современная наука: тенденции развития, проблемы и перспективы» посвященная 10-летию аспирантуры РАУ (23-25 сентября, 2013 г., Ереван, Армения), на восьмом конгрессе «Европа против боли» (8th Congress of the European Federation of IASP Chapters) (9-12 октября, 2013 г., Флоренция, Италия), на втором заседании молодых ученых «Достижения и перспективы молодых ученых» (1-3 ноября, 2013 г., Агверан, Армения), на 34-ом научном заседании американского общества боли (The 34th Annual Scientific Meeting of the American Pain Society) (13-16 мая, 2015 г., Калифорния, США).

Публикации. Основные результаты данного исследования отражены в 11 публикациях, как в отечественных, так и в международных научных изданиях.

Структура и объем работы. Работа изложена на 130 страницах машинописного текста, состоит из списка сокращений, введения, глав литературного обзора, описания материалов и методов, изложения экспериментального материала и обсуждения результатов, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 297 источников. Работа иллюстрирована 15 таблицами и 35 рисунками.

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

В обзоре литературы приводятся: значение ноцицепции и боли для организма и его молекулярные механизмы, методы изучения ноцицепции, общая характеристика животных ядов, их болевые и обезболивающие свойства, описание эндогенной опиоидной и канбиноидной/эндованилоидной систем и их значение в регуляции процессов боли и воспаления. Дан обзор свойств аминокислоты таурина и его конъюгатов, а также рассмотрен механизм их анальгетического воздействия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в лаборатории пурификации, сертификации и стандартизации физиологически активных веществ Института физиологии им. академика Л.А. Орбели НАН РА.

Экспериментальные животные

В исследованиях были использованы 350 беспородных половозрелых самцов белых мышей и 27 половозрелых самцов белых крыс, массой 20-30г и 200-250г соответственно. В ходе экспериментов были использованы растворы ядов, восстановленных из кристаллов, высушенных в эксикаторе над силикагелем, в условиях вакуума (-0.9 атм).

Методы исследований ноцицептивного поведения

Формалиновый тест: 5% формалин вводили подкожно (п/к) (позитивный контроль) в заднюю лапку мышей. Негативным контролем служило п/к введение физиологического раствора (0.9 % NaCl). Тестируемые вещества вводились внутрибрюшинно (в/б) в объеме 0.1 мл за 15 мин до введения формалина в лапку. Контрольным животным в том же объеме вводили в/б физиологический раствор. Сразу после введения формалина, мыши помещались в прозрачную пластиковую камеру для подсчета количества лизаний/кусаний лапки (ноцицептивное поведение) за каждую минуту. Продолжительность регистрации ноцицептивного поведения во время эксперимента равнялась 45 мин.

Метод исследования ноцицептивного эффекта ядов: исследования проводились по той же схеме, что и при формалиновом тесте, однако вместо формалина п/к вводился раствор яда в дозе 0.04 мг в 20 мкл /мышь.

Тест «Горячая пластина» («Hot Plate»): В этом тесте использовалась нагретая до 54⁰С алюминиевая пластина. Для определения термальной гипералгезии яд гюрзы вводился п/к в заднюю левую лапку в дозе 0.04 мг в 20 мкл /мышь. Контрольным животным п/к вводили такое же количество 0.9 % NaCl. Мыши помещались на горячую пластину через 5, 15 и 30 мин после введения яда. Фиксировалось латентное время либо первого лизания пораженной лапки, либо прыжка. Так определялся пик ноцицептивного действия яда. При отсутствии какой либо реакции, стандартное латентное время брали в 30 секунд и животное убиралось с пластины.

Токсикологические исследования

Определение летальной дозы яда MLO, при котором погибают 50% исследуемых животных (Lethal Dose 50%, LD_{50}), было проведено на мышах по методу Беренса (Behrens and Schlosser, 1957).

Методы исследований *in vitro*

Ингибирование Фосфолипазы A2 яда MLO: Ингибирование Фосфолипазы A2 (Phospholipase A2, PLA₂) яда MLO было проведено согласно методу, описанному Самелом и коллегами с наибольшими модификациями (Samel et al., 2013). Яд MLO и ингибитор PLA₂ бромфенацилбромид (p-bromophenacyl bromide, p-BPB) были растворены в 0.1M Na-фосфатном буфере (ФБ) (смесь Na₂HPO₄ и NaH₂PO₄, pH=7.4) в соотношении 10:1 (30мг MLO + 3мг p-BPB + 3мл 0.1M ФБ), и инкубированы в течение двух часов при комнатной температуре. После окончания инкубации раствор яда был протестирован экспресс-методом определения фосфолипазной активности (Восканян и др., 2003).

Суммарная инактивация сериновых и металлсодержащих протеаз: Известно, что активность протеаз яда крайне чувствительна к температурам выше 60⁰C, а PLA₂ сохраняют активность при 70⁰C и выше (de Queiroz et al., 2014, Menaldo et al., 2012, Ramirez-Avila J., 2004). Руководствуясь этими данными, мы использовали крайне простой и быстрый метод термической инактивации протеаз яда MLO. Для этого яд был растворен в 0.1M ФБ (pH=7.4) в концентрации 10 мг/мл и проинкубирован на водяной бане при температуре 70⁰C в течение 30 мин. После инкубации раствора отсутствие активности сериновых и металлсодержащих протеаз яда было протестировано методом определения казеинолитической активности яда MLO (Voskanyan et al., 2009, Восканян и др., 2003).

Исследование активности компонентов яда *in vitro*: Были использованы экспресс-методы качественного определения ферментативной активности PLA₂ и протеаз яда MLO. Для определения активности PLA₂ интактный или ингибированный при помощи p-BPB яд был проинкубирован в соотношении 1:5000 (из расчета 1 мг яда на 5 мл) с желточно-фосфатной смесью (0.1M ФБ с яичным желтком в соотношении 1:1, pH=7,4) в течение 30 мин при 38⁰C. Затем пробирки с инкубационной смесью переносили в кипящую воду (98⁰C) на 10 мин. В случае, если после кипячения сворачивания желтка не происходит, то это свидетельствует о наличии PLA₂ активности, т.к. разрушаются фосфолипиды желтка и образуются свободные жирные кислоты, которые нарушают процесс сворачивания желточного белка. Если наблюдается сворачивание желточно-фосфатной смеси, значит произошло ингибирование активности PLA₂. Для определения ферментативной активности протеаз яд MLO инкубировали с натуральным нормализованным молоком (производство компании «Аштарак-Кат») в соотношении 1:5000 в течение 30 мин при 38⁰C. При наличии казеинолитической активности, качественный стандартизированный яд MLO сворачивает молоко в течение первых 20 мин после начала инкубации (Voskanyan et al., 2009, Восканян и др., 2003).

Определение содержания воспалительных цитокинов в сыворотке крови крыс

Содержание цитокинов TNF- α , IL-8, IL-6 было определено методом иммуноферментного анализа (Enzyme-linked immunosorbent Assay, **ELISA**). Процедуры проводились с использованием готовых наборов (Gen-Probe Diacclone, Франция) в соответствии с инструкциями производителя. Все исследуемые образцы и соответствующие контрольные пробы анализировались в двух параллелях. Измерения проводились на микропланшетном спектрофотометре («Stat Fax 3200» Awareness Technology Inc., США). Концентрацию цитокинов выражали в пг/мл сыворотки крови.

Статистическая обработка данных

Для статистического анализа данных применялся программный пакет Graph Pad Prism (Graph Pad Software Inc., USA, 2003). Результаты поминутных наблюдений были усреднены как для всего экспериментального периода (45 мин), так и для анализа динамики изменения

ноцицептивного поведения (в 5-минутных интервалах). Для сравнения данных нескольких экспериментальных групп был использован тест «One way ANOVA followed by Bonferroni Multiple Comparison Test», а для сравнения двух групп - t-тест Стьюдента. Значения $p < 0.05$ считались статистически достоверными. Результаты представлены как среднее арифметическое значение \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Сравнительное исследование ноцицептивного действия ядов некоторых гадюковых змей и членистоногих. Результаты сравнительного исследования ноцицептивного поведения при действии ядов гадюковых показали, что яд MLO обладает большим ноцицептивным эффектом по сравнению с ядами VRR и MRR. Среднее значение суммарного количества лизаний задней лапы за 45 мин в группе MLO было в 1.5 и 1.8 раз выше по сравнению с группами VRR и MRR (Рис. 1, Таблица 1). Из числа исследованных нами ядов членистоногих, яд BE, по сравнению с ядом пчелы медоносной (*Apis mellifera*, AM), а также по сравнению с исследованными ядами гадюковых, вызывал у мышей большую по интенсивности ноцицептивную реакцию (Таблица 1).

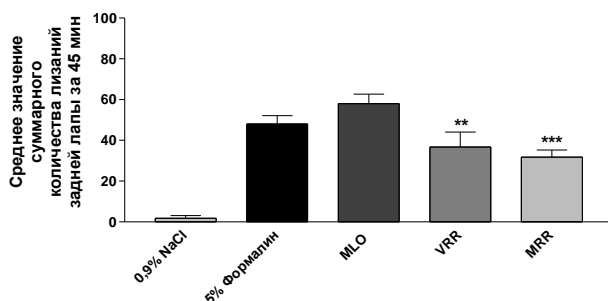


Рис. 1. Сравнительная диаграмма ноцицептивного действия змеиных ядов семейства гадюковых. Ноцицептивная реакция на введение 0.9%-го NaCl принята за негативный контроль, а 5%-го формалина - позитивный контроль. VRR и MRR сравнивались с MLO, использовался тест «One way ANOVA followed by Bonferroni Multiple Comparison Test».

** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$.

Полученные нами данные о ноцицептивном действии исследованных ядов находятся в соответствии с клиническими данными о болевой симптоматике, сопровождающей укусы. Укусы MLO и MRR сопровождаются сильным отеком, геморрагиями, воспалительной реакцией и болью (Arakelyan et al., 2011, Göçmen et al., 2006). Укусы VRR также имеют выраженные локальные эффекты: отек, миолиз и боли в месте укуса (Kularatne et al., 2014, Ramachandran et al., 1994). Однако следует отметить, что действие яда VRR, в отличие от ядов MLO и MRR, имеет также и выраженный нейротропный эффект (Kularatne et al., 2014). Действие яда BE приводит к острой боли, жжению и отеку в месте инокуляции (Cesaretti and Ozkan, 2010). Имеется неоднозначное мнение о болевом действии яда AM. Как известно, ужаление пчелы вызывает острые локальные боли и отек, что связано в основном с действием мажорного компонента яда, мелиттина (Brigatte et al., 2011). Однако при воспалительных

процессах, яд пчелы и некоторые его минорные фракции (адолапин, тертиапин) могут проявлять анальгетические свойства (Chen and Lariviere, 2010, Merlo et al., 2011).

Таблица 1.

Сравнительные данные среднего количества лизаний/кусаний (ноцицептивная реакция) задней лапки у мышей за 45 мин после п/к введения различных ядов в лапку.

Экспериментальная группа		Количество лизаний/кусаний за 45 мин (M±SD)
Контроль	0,9 % NaCl (n=6)	1.8±1.3
Химический агент	5% Формалин (n=14)	48.0±4.1
Яды гадюковых	MLO (n= 9)	53.0±8.7
	VRR (n= 6)	36.7±7.3**
	MRR (n= 10)	31.8±3.5***
Яды членистоногих	BE (n= 6)	75.7±9.7
	AM (n= 6)	41.2± 9.2***

Примечание: M±SD – среднее арифметическое значение ± стандартное отклонение; MLO – *Macrovipera lebetina obtusa* (гюрза кавказская); VRR – *Vipera russelli russelli* (гадюка Рассела); MRR – *Montivipera raddei raddei* (гадюка армянская); BE – *Buthus eupeus* (скорпион пестрый); AM – *Apis mellifera* (пчела медоносная); n – количество мышей в группе. ** p<0.01 для MLO/VRR, ***p<0.001 для MLO/MRR и BE/AM.

Исследование роли фосфолипазы A2 и протеаз яда гюрзы в патофизиологии развития ноцицептивных процессов. Согласно полученным нами данным, ингибирование PLA₂ яда MLO приводило к снижению ноцицептивной активности мышей (уменьшению среднего количества лизаний/кусаний задней лапки) практически в 3 раза по сравнению с нативным ядом (Рис. 2; Таблица 2). Инактивирование протеаз яда MLO не выявило никаких достоверных отличий от нативного яда (Таблица 2).

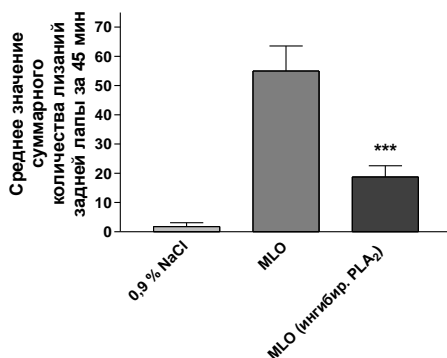


Рис. 2. Сравнительная диаграмма среднего количества лизаний/кусаний задней лапки у мышей (ноцицептивное поведение) за 45 мин после п/к введения 0,9% NaCl, нативного яда MLO и MLO с ингибированной PLA₂. Группу MLO с ингибированной PLA₂ сравнивали с MLO. В качестве критерия оценки различия использовался t-тест Стьюдента. ***p<0.001.

Таблица 2.

Сравнительные данные среднего количества лизаний/кусаний задней лапки у мышей (ноцицептивная реакция) за 45 мин после п/к введения в лапку 0.9% NaCl, нативного яда MLO, MLO с ингибированной PLA₂ и MLO с инактивированными протеазами.

Экспериментальная группа	Количество лизаний/кусаний за 45 мин (M±SD)	Ослабление действия яда (%)	Достоверность отличия от MLO (p)
Контроль (0,9 % NaCl) (n=6)	1.8±1.3	—	—
MLO (n=9)	53.0±8.7	—	—
MLO (с ингибир. PLA ₂) (n=6)	18.7±3.8	64.7	p<0.001
MLO (с инактив. протеазами) (n=6)	55.5±6.5	—	—

Примечание: M±SD – среднее арифметическое значение ± стандартное отклонение; MLO – *Macrovipera lebetina obtusa* (гюрза кавказская); PLA₂ – фосфолипаза A2; n – количество мышей в группе.

Результаты токсикологических исследований показали, что значение LD₅₀ при п/к введении яда MLO составляет 23 мг/кг (Рис. 3). В наших экспериментах по п/к введению яда MLO использовалась доза равная 1/10 LD₅₀ (т.е. примерно 2 мг/кг массы тела). Таким образом, использование данной дозы яда MLO для моделирования болевых процессов у мышей было оправдано в плане безопасности и практически исключало летальный исход не только во время эксперимента, но и в дальнейшем. Следует специально отметить, что эти мыши использовались в экспериментах однократно, дабы исключить возможность развития иммунных реакций и искажения опытных данных.

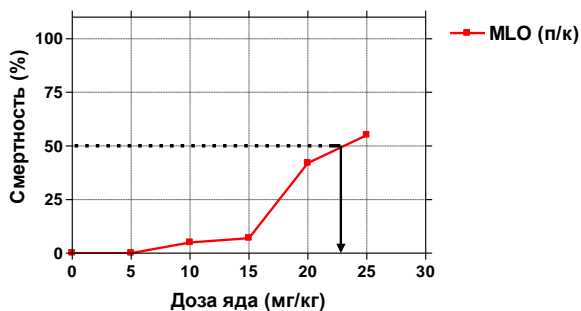


Рис. 3. Кривая зависимости % смертности животных от использованной дозы при п/к введении нативного яда MLO для определения токсичности LD₅₀ по методу Беренса.

В наших исследованиях было также выяснено, что ингибирование PLA₂ примерно в 2 раза снижало токсичность яда для в/б введения. Значение LD₅₀ при ингибировании PLA₂ смещалось с 1.9 до 3.4 мг/кг (Рис. 4).

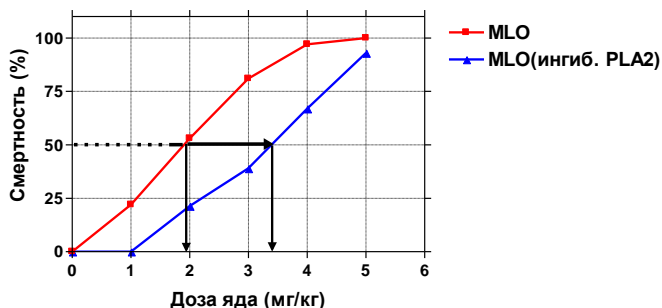


Рис. 4. Кривые зависимости % смертности животных от использованной дозы при в/б введении нативного яда MLO и яда с ингибированной PLA₂ для определения токсичности LD₅₀ по методу Беренса.

Исследования роли PLA₂ ядов гадюковых в патофизиологии развития ноцицептивных процессов находятся в согласии с полученными нами данными при ингибировании PLA₂ яда MLO. Чакур и коллеги показали повышение механической гипералгезии после п/к введения в заднюю лапку мышей двух изоформ PLA₂ яда *Bothrops asper* (Chacur et al., 2004). Согласно исследованию Зайхара и коллег, ингибирование PLA₂ яда *Bothrops jararaca* при помощи р-VPB приводило к значительному снижению у мышей гипералгезии/аллодинии, вызванной п/к введением яда в заднюю лапку (Zychar et al., 2010).

Антиноцицептивные и противовоспалительные свойства таурина при действии яда гюрзы. Согласно литературным данным таурин проявляет антиноцицептивные свойства на разных моделях боли (Silva et al., 1993, Terada et al., 2011). Результаты наших исследований показали, что внутрибрюшинное введение таурина в дозе 100 мг/кг за 15 мин до введения яда MLO в лапку, в 1.9 раз снижало ноцицептивное действие яда (Рис. 5; Таблица 3). Кроме таурина также был протестирован ряд противовоспалительных препаратов с анальгетическими свойствами стероидного и нестероидного происхождения: дексаметазон, диклофенак и анальгин. Внутрибрюшинное введение дексаметазона (15 мг/кг), диклофенака (20 мг/кг) и анальгина (100 мг/кг) (Beirith et al., 1998, Bukhari et al., 2007, Spindola et al., 2012), приводило к снижению ноцицептивной реакции мышей, соответственно, в 2, 2.6 и 3.3 раза (Рис. 5; Таблица 3).

Кроме использования перечисленных противовоспалительных препаратов в качестве анальгетических средств, нами также был использован яд кобры среднеазиатской (*Naja naja oxiana*, NOX). Мы основывались на предположении о возможном антиноцицептивном действии яда кобры против яда MLO, исходя из того факта, что такой эффект известен для ядов кобр при развитии болевых ощущений разной этиологии (Gong et al., 2015, Zhu et al., 2013). Нами были получены данные о том, что в/б введение яда NOX в дозе 0.12 мг/кг (1/10 LD₅₀ для в/б введения) (Аникиенко и др., 2001) за 15 мин до п/к введения яда MLO, в 3.5 раза уменьшает ноцицептивный ответ животных (Рис. 5; Таблица 3). Механизм действия этого яда, вероятно, связан с ингибированием мускариновых и никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, что в свою очередь блокирует ноцицептивную афферентную передачу (Gong et al., 2015, Shi et al., 2011, Zhang et al., 2012). Чтобы выяснить отличаются ли механизмы действия таурина и NOX, нами был сделан эксперимент при сочетанном в/б введении яда NOX и таурина в тех же дозах, что и вводились по отдельности. Согласно полученным данным, ноцицептивное поведение мышей в группе медицированной в/б NOX и таурином за 15 мин до

п/к введения MLO в лапку, было в 1.7 раз меньше по сравнению с группой, получившей только в/б NOX (Рис. 5; Таблица 3). Полученные данные показали «аддитивный» антиноцицептивный эффект сочетанного введения таурина и NOX, что свидетельствует о разных механизмах их действия.

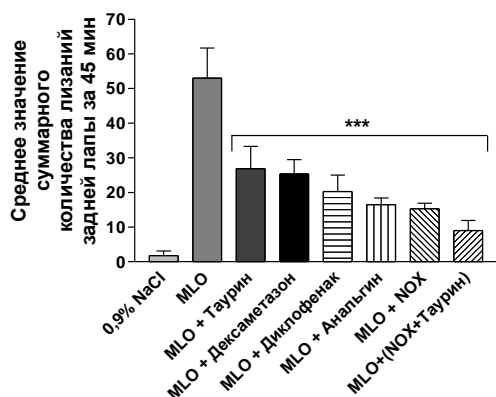


Рис. 5. Сравнительная диаграмма среднего количества лизаний/кусаний задней лапки у мышей (ноцицептивное поведение) за 45 мин после п/к введения 0.9% NaCl, яда MLO и п/к яда MLO + в/б тестируемые препараты (таурин, дексаметазон, диклофенак, анальгин, NOX, NOX+Таурин). Действие тестируемых препаратов сравнивалось с MLO, использовался тест «One way ANOVA followed by Bonferroni Multiple Comparison Test». *** $p < 0.001$.

Таблица 3.

Сравнительные данные среднего количества лизаний/кусаний задней лапки у мышей (ноцицептивная реакция) за 45 мин после п/к введения 0.9% NaCl, яда MLO и п/к яда MLO + в/б тестируемые препараты (таурин, дексаметазон, диклофенак, анальгин, NOX и NOX +Таурин).

Экспериментальная группа	Количество лизаний/кусаний за 45 мин (M±SD)	Ослабление действия яда (%)	Достоверность отличия от MLO (p)
Контроль (0,9 % NaCl) (n=6)	1.8±1.3	—	—
MLO (n=9)	53.0±8.7	—	—
MLO + Таурин (n= 9)	26.8±6.4	49.4	p<0.001
MLO + Дексаметазон (n=6)	25.3±4.2	52.3	p<0.001
MLO + Диклофенак (n=6)	20.3±4.7	61.7	p<0.001
MLO + Анальгин (n=6)	16.5±1.9	68.9	p<0.001
MLO + NOX (n=6)	15.3±1.5	71.1	p<0.001
MLO + (NOX + Таурин) (n=6)	9.0±2.9	83.0	p<0.001

Примечание: M±SD – среднее арифметическое значение ± стандартное отклонение; MLO – *Macrovipera lebetina obtusa* (гюрза кавказская); NOX – Среднеазиатская кобра (*Naja naja oxiana*); n – количество мышей в группе.

При измерении уровней цитокинов воспаления, были выявлены противовоспалительные свойства аминокислоты таурина. Результаты определения количества цитокинов в сыворотке

крови крыс показали, что через 60 мин после внутрибрюшинного введения яда MLO происходило достоверное повышение уровней цитокинов TNF- α , IL-6 и IL-8 ($p < 0,001$). Сочетанное введение таурина с ядом приводило к уменьшению воспаления, что проявлялось в нормализации уровня TNF- α и многократном снижении уровня хемокина воспаления IL-8 ($p < 0,001$). Действие таурина ослабляло экспрессию TNF- α в 1.4 раза (на 28.6%), IL-8 – в 11.5 раз (на 91.3%) и приводило к достоверному повышению количества цитокина IL-6 в сыворотке крови в 1.5 раза (на 36.5%) ($p < 0,001$) (Рис. 6, 7, 8; Таблица 4).

Согласно литературным данным, действие ядов гадюковых и их отдельных компонентов приводит к повышению локального и системного уровней таких провоспалительных цитокинов, как TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 и IL-10 (Avila-Agüero et al., 2001, Chacur et al., 2004, Rucavado et al., 2002, Santhosh et al., 2013, Setubal et al., 2013). Имеются данные относительно того, что экзогенно введенный таурин уменьшает отек и достоверно снижает уровень 17 цитокинов воспаления (IL-1 α, β ; IL-4-6; IL-10; TNF- α и т.д.) на модели травматического повреждения головного мозга крыс (Su et al., 2014).

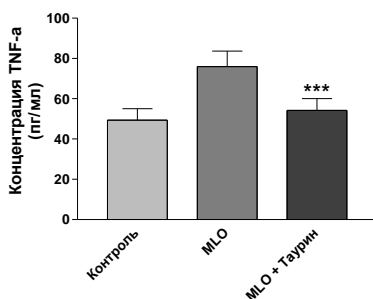


Рис. 6. Сравнительная диаграмма концентраций цитокина TNF- α в сыворотке крови крыс в норме (Контроль), при действии яда (MLO) и сочетанном применении яда и таурина (MLO+Таурин). Группу MLO+Таурин сравнивали с MLO. В качестве критерия оценки различия использовался t-тест Стьюдента. *** $p < 0.001$.

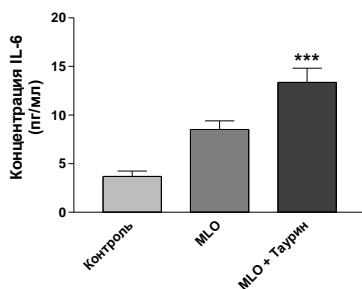


Рис. 7. Сравнительная диаграмма концентраций цитокина IL-6 в сыворотке крови крыс в норме (Контроль), при действии яда (MLO) и сочетанном применении яда и таурина (MLO+Таурин). Группу MLO+Таурин сравнивали с MLO. В качестве критерия оценки различия использовался t-тест Стьюдента. *** $p < 0.001$.

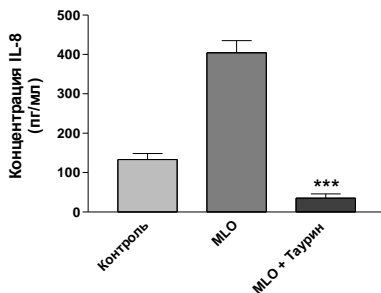


Рис. 8. Сравнительная диаграмма концентраций цитокина IL-8 в сыворотке крови крыс в норме (Контроль), при действии яда (MLO) и сочетанном применении яда и таурина (MLO+Таурин). Группу MLO+Таурин сравнивали с MLO. В качестве критерия оценки различия использовался t-тест Стьюдента. *** $p < 0.001$.

Таблица 4.

Концентрация исследованных цитокинов в сыворотке крови крыс в норме, после введения яда MLO и MLO с таурином.

Цитокин	Концентрация (M±SD)		
	(Контроль) (пг/мл)	(MLO) (пг/мл)	(MLO+Таурин) (пг/мл)
TNF-α	49.15±5.7	75.9±7.6	54.2±5.8
IL-6	3.7±0.55	8.5±0.88	13.4±1.5
IL-8	133.2±15.3	404.3±30.7	35.1±10.9

Примечание: M±SD – среднее арифметическое значение ± стандартное отклонение; MLO – *Macrospira lebetina obtusa* (гюрза кавказская); TNF- α – фактор некроза опухолей- α ; IL – интерлейкины; количество крыс в каждой группе равно 3.

Антиноцицептивные свойства конъюгатов таурина с жирными кислотами (N-ацил амиды) при действии яда гюрзы. Нами было предложено, что взаимодействие экзогенного таурина с дериватами действия яда гюрзы (жирными кислотами) может привести к формированию конъюгатов таурина *in vivo*, которые могут играть роль в его антиноцицептивном эффекте. Чтобы косвенно доказать эту гипотезу, нами были проведены серии экспериментов с экзогенным введением искусственно синтезированных конъюгатов таурина с арахидоновой и олеиновой кислотами – N-арахидоноил таурин (**AA-Tau**) и N-олеил таурин (**OL-Tau**) (все исследованные N-ацил амиды производства лаборатории Оксипипинов ИБХ РАН, зав. лаб., д.х.н. Безуглов В.В.). Согласно полученным данным, внутривенное введение AA-Tau и OL-Tau в дозе 5 мг/кг за 15 мин до введения яда MLO в лапку, приводило к снижению ноцицептивного действия яда, соответственно в 1.5 (31.5%) и 1.3 (22,6%) раза (Рис. 9; Таблица 5). За субконтроль, с которым сравнивали действие конъюгатов, бралась буферная смесь (**MLO + Буфер**) для приготовления растворов конъюгатов. Буферная смесь состояла из Tween-80: раствора конъюгата в спирту (для субконтроля просто спирт): физиологического раствора в соотношении 1:1:18.

В сравнительных исследованиях были использованы также ряд конъюгатов других физиологически активных соединений: N-арахидоноил серотонин (**AA-5HT**), N-арахидоноил

этаноламин или анандамид (AEA) и N-арахидоноил дофамин (AA-DA) и N-арахидоноил ванилин (AA-VAN). Внутривентрикулярное введение AA-5HT, AEA, AA-DA и AA-VAN в дозе 5 мг/кг за 15 мин до введения яда MLO в лапку приводило к снижению ноцицептивного действия яда, соответственно в 1.2 (19.0%), 1.8 (45.7%), 2.2 (55.4%) и 3.5 раза (71.7%). Наиболее выраженный эффект был получен при действии синтетического AA-VAN (Рис. 9; Таблица 5). Следует отметить, что достоверного отличия между эффектами AA-5HT, AA-Tau и OL-Tau не наблюдалось. Не отличались также эффекты AEA и AA-DA.

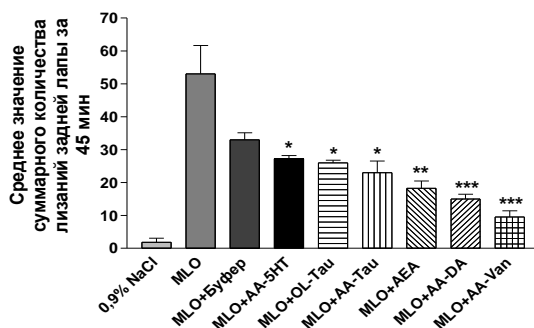


Рис. 9. Сравнительная диаграмма среднего количества лизаний/кусаний задней лапки у мышей (ноцицептивное поведение) за 45 мин после п/к введения 0.9% NaCl, яда MLO, MLO+Буфер конъюгатов и п/к MLO + в/б тестируемые конъюгаты. Действие тестируемых конъюгатов сравнивалось с субконтролем (MLO+Буфер). В качестве критерия оценки использовался тест «One way ANOVA followed by Bonferroni Multiple Comparison Test». * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Таблица 5.

Сравнительные данные среднего количества лизаний/кусаний задней лапки у мышей (ноцицептивная реакция) за 45 мин после п/к введения 0.9% NaCl, яда MLO, яда MLO + Буфер (субконтроль) и п/к MLO + в/б тестируемые N-ацил амиды.

Экспериментальная группа	Количество лизаний/кусаний за 45 мин (M±SD)	Ослабление действия яда (%)	Достоверность отличия от субконтроля (p)
Контроль (0,9 % NaCl) (n=6)	1.8±1.3	—	—
MLO (n=9)	53.0±8.7	—	—
MLO + Буфер (Субконтроль) (n=6)	33.6±2.1	—	—
MLO+AA-5HT (n=6)	27.2±0.9	19.0	p<0.05
MLO+OL-Tau (n=6)	26.0±0.8	22.6	p<0.05
MLO+AA-Tau (n=6)	23.0±2.8	31.5	p<0.05
MLO + AEA (Anandamide) (n=6)	18.2±2.2	45.7	p<0.01
MLO+AA-DA(n=6)	15.0±1.4	55.4	p<0.001
MLO+AA-VAN (n=6)	9.5±1.9	71.7	p<0.001

Примечание: M±SD – среднее арифметическое значение ± стандартное отклонение; MLO – *Macrovipera lebetina obtusa* (гюрза кавказская); n – количество мышей в группе.

Таким образом, анализируя данные, полученные при ингибировании PLA_2 яда MLO, антиноцицептивным действием таурина и противовоспалительных препаратов, можно предположить, что кроме известного механизма действия таурина в качестве агониста глициновых и ГАМК рецепторов (Nguyen et al., 2013, Wu et al., 2008), есть некий общий механизм влияния таурина на метаболизм арахидоновой кислоты (прекурсор простагландинов). Механизм антиноцицептивного действия конъюгатов таурина вероятно связан с центральной и периферической активацией TRPV1 и TRPV4 рецепторов (Saghatelian et al., 2006). Базируясь на нашей гипотезе о возможном формировании конъюгатов таурина *in vivo*, мы предположили, что существует некий эндокринный механизм транспорта новосинтезированных конъюгатов в ЦНС и на периферию (Reilly et al., 2007, Long et al., 2011). Вероятное объяснение практически одинакового эффекта AEA и AA-DA связано с тем, что они имеют одинаковые мишени действия – оба являются агонистами CB_1 и TRPV1 (Bezuglov et al., 2001, Bezuglov et al., 1998, Di Marzo et al., 2001, Price et al., 2004). AA-VAN больше всего ингибирует действие яда вероятно из-за того, что помимо действия на CB_1 , CB_2 и TRPV1, ингибирует также и FAAH ($IC_{50} = 32 \text{ мкМ}$) - фермент ответственный за расщепление AEA и 2-AG (это приводит к повышению их концентрации) и обратный транспорт AEA ($IC_{50} = 3.6 \text{ мкМ}$) (Di Marzo et al., 2001, Di Marzo et al., 2002). Необходимо отметить, что AA-5HT блокирует TRPV1 каналы ($IC_{50} = 74 \pm 9 \text{ нМ}$) и, подобно AA-VAN-у, ингибирует фермент FAAH ($IC_{50} = 12 \text{ мкМ}$), однако обладает менее выраженным по сравнению с AA-VAN-ом действием вероятно из-за отсутствия эффекта на CB_1 и CB_2 рецепторы.

Таким образом, результаты настоящих исследований дают основание полагать, что таурин, наряду с дексаметазоном, диклофенаком и анальгином, может быть использован в качестве обезболивающего и противовоспалительного средства при укусах гюрзы. Считаем возможным также применение некоторых протестированных N-ацил амидов, в частности Арванила, для лечения болезненных симптомов при действии яда.

ВЫВОДЫ

Исходя из полученных в данной работе результатов, можно прийти к следующим основным выводам:

1. Яд гюрзы кавказской обладает значительно более выраженным ноцицептивным эффектом по сравнению с ядами гадюки Рассела и гадюки армянской, незначительно уступая яду скорпиона пестрого.
2. Ноцицептивный эффект яда гюрзы кавказской с ингибированной фосфолипазой A2 значительно менее выражен по сравнению с действием нативного яда (в 3 раза или на 64.7%), что свидетельствует о существенном вкладе фосфолипазы A2 в развитии патофизиологии боли.
3. Инактивация протеаз яда гюрзы кавказской исключает повышение чувствительности к температурным воздействиям, что указывает на важность данных компонентов яда в развитии термальной гипералгезии.
4. Таурин, дексаметазон, диклофенак и анальгин проявляют антиноцицептивный эффект при действии яда гюрзы кавказской (ослабление на 49.4, 52.3, 61.7 и 68.9%, соответственно).
5. Яд кобры среднеазиатской в малых дозах вызывает сильно выраженное ослабление ноцицептивного поведения мышей (на 71.1%). При сочетанном введении яда кобры и таурина получается «аддитивный» эффект (снижение на 83%), что является косвенным доказательством различия механизмов их антиноцицептивного действия.
6. Аминокислота таурин обладает противовоспалительными свойствами при действии яда гюрзы кавказской, что проявляется в уменьшении продукции провоспалительных

цитокинов фактора некроза опухолей- α (на 28.6%) и интерлейкина-8 (на 91.3%), с одновременным повышением продукции противовоспалительного цитокина интерлейкина-6 (на 36.5%).

7. Выявлены антиноцицептивные свойства эндогенных и синтетических N-ацил амидов (агонистов канабиноидных и ванилоидных рецепторов). N-арахидоноил таурин и N-олеоил таурин ослабляют ноцицептивный эффект яда гюрзы кавказской (на 31.5 и 22.6%, соответственно), подкрепляя гипотезу возможного антиноцицептивного эффекта образованных *in vivo* конъюгатов при действии яда и экзогенного таурина.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Հովհաննիսյան Մ.Գ., Ոսկանյան Ա.Վ., Քնշատաշյան Ա.Ռ., Աստուխյան Մ.Վ., Դարբինյան Ա.Ա. (2013) ԱՄԻՆԱԹԹՈՒ ՏԱՌԻՐԻՆԻ ՀԱՎԱՅԱՎԱՅԻՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԿՈՎՎԱՍՅԱԼ ԳՅՈՒՐԶԱՅԻ ՄԱԿՐՈՎԻՔԵՐԱ ԼԵԲԵՏԻՆԱ ՕԲՏՄԱՅԻ ԹՈՒՅԼԻ ԱՌԱՋԱՑԴԱԾ ՊԵՐԻՖԵՐԻԿ ԲՈՐԲՈՔԱՅԻՆ ՑԱՎԻ ԴԵՄ. «Երիտասարդ գիտնականների ձեռքբերումներն ու հեռանկարները», Երիտասարդ գիտնականների II համաժողով: 1-3 նոյեմբերի, Արվերան, Հայաստան, էջեր 68-73:
2. Оганесян М.Г., Дарбинян А.А. (2013). Антиноцицептивный эффект сульфаминокислоты таурина при действии яда кавказской гюрзы (*Macrovipera lebetina obtusa*). Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2013». 8-13 апреля. Москва, Россия. стр 341.
3. Оганесян М.Г. (2013) Ноцицептивное действие яда Кавказской гюрзы *Macrovipera lebetina obtusa*. Международный аспирантский форум «Современная наука: тенденции развития, проблемы и перспективы» посвященная 10-летию аспирантуры РАУ. 23-25 сентября. Ереван, Армения, стр. 59-61.
4. Оганнисян М.Г. (2014) Сравнительное исследование ноцицептивного действия некоторых животных ядов. Вестник РАУ, №2, стр 59-67.
5. Оганнисян М.Г., Дарбинян А.А., Восканян А.В. (2014) ТАУРИН РЕГУЛИРУЕТ УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ ВОСПАЛЕНИЯ В КРОВИ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЯДА КАВКАЗСКОЙ ГЮРЗЫ (*MACROPIVERA LEBETINA OBTUSA*). Гюмрийский Государственный Педагогический Институт им. М. Налбандяна, Ученые Записки. Выпуск А, №1, стр. 161-167.
6. Hovhannissyan M.G., Antonyan M.V., Voskanyan A.V. (2013) Nociceptive action of Levantine viper venom. Third Jubilee International Conference of Neuroscience and Biological Psychiatry. September 22-24. Yerevan, Armenia, p. 53-54.
7. Hovhannissyan M., Voskanyan A., Darbinyan A., Antonyan M. (2013) Investigation of antinociceptive effects of taurine and some phytopreparations during *Macrovipera lebetina obtusa* venom action. 8th Congress of the European Federation of IASP Chapters. 9-12 October. Florence, Italy, page 414.
8. Hovhannissyan M., Voskanyan A., Bezuglov V., Vardapetyan H., Koshatashyan H., Darbinyan A., Antonyan M. (2015) Phospholipase A2 of *Macrovipera lebetina obtusa* venom as a main target to relief pain after snake bites. The 34th Annual Scientific Meeting of the American Pain Society, 13-16 May, Palm Springs, USA. Published in Journal of Pain supplements Volume 16, Issue 4, page S44.
9. Hovhannissyan M., Voskanyan A., Bezuglov V., Darbinyan A., Koshatashyan H., Antonyan M. (2015) Screening of several N-acyl amides for antinociceptive properties against pain induced by Levantine viper venom. The 34th Annual Scientific Meeting of the American Pain Society, 13-16 May, Palm Springs, USA. Published in Journal of Pain supplements Volume 16, Issue 4, page S78.

10. Voskanyan A.V., Bezuglov V.V., Antonyan M.V., Gevorgyan S.S., Darbinyan A.A., Hovhannisyan M.G., Koshatashyan A.R. (2013) Strengthening of hemorrhagic action of levantine viper venom on the microcirculatory bed of murines with the injection of the conjugates of taurine. Third Jubilee International Conference of Neuroscience and Biological Psychiatry. September 22-24. Yerevan, Armenia, p. 36-37.
11. Voskanyan AV, Vardapetyan HR, Hovhannisyan MG, Antonyan MV and Darbinyan AA (2014) THE ANTINOCICEPTIVE EFFECT OF TAURINE AGAINST LEVANTINE VIPER (*Macrovipera lebetina obtusa*) VENOM. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences 2(6): 608-617.

Հովհաննիսյան Մկրտիչ Գազիկի

ՍՈՒԼՖՈՍԻՆՆՈԹՈՒՅՍԱՌԻՐԻՆԻ ՀԱԿԱՆՈՑԻՑԵՊՏԻՎ ԷՖԵԿՏԸ ԳՈՎԿԱՍՅԱՆ
ԳՑՈՒՐԶԱՅԻ ԹՈՒՅՆԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՊԱՐԱԳԱՅՈՒՄ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Աշխատանքը նվիրված է Կովկասյան գյուրգայի թույնի ազդեցության պարազայում մի շարք ֆիզիոլոգիապես ակտիվ միացությունների՝ տաուրինի և նրա ճարպաթթվային կոնյուգատների, որոշ N-ացիլ ամիդների և հակաբորբոքային պատրաստուկների (անամգին, դիկլոֆենակ, դեքսամետազոն) հականոցիցեպտիվ հատկությունների ուսումնասիրմանը: Իժերի թույնի քայքայիչ ազդեցությունը հայտնի է, սակայն բացի վնասող ազդեցությունից օձերի թույները ունեն նաև մոդուլացնող ազդեցություն նոցիցեպտիվ (ցավային ինֆորմացիայի փոխանցման) գործընթացների վրա: Հայաստանում ամենատարածված օձի տեսակներից է Կովկասյան գյուրգան (*Macrovipera lebetina obtusa*), որի խայթոցները զուգորդվում են ուժգին ցավով: Բժշկության մեջ կիրառվող ամենաարդյունավետ հակացավային միջոցները ունեն բազմաթիվ կողմնակի անցանկալի ազդեցություններ: Այսպիսով, ավելի քիչ կողմնակի ազդեցությամբ հակացավային և հակաբորբոքային պատրաստուկների մշակումը և կիրառումը հանդիսանում է ժամանակակից գիտության և բժշկության կարևորագույն և արդիական խնդիրներից մեկը: Հակացավային հատկություններ ունեն ոչ միայն վերը նշված անալգետիկները, այլ նաև մի շարք ֆիզիոլոգիապես ակտիվ միացություններ, որոնք մասնակցում են օրգանիզմի նյութափոխանակությանը և կապված են նոցիցեպտիվ ինֆորմացիայի ընկալման և հաղորդման գործընթացների հետ: Նման ֆիզիոլոգիապես ակտիվ միացություն է հանդիսանում ազատ, ոչ սպիտակուցային ամիտաթթու տաուրինը: Նույնիսկ մեծ չափաբաժիններով էկզոգեն տաուրինի ընդունման դեպքում այն չի ցուցաբերում տոքսիկ ազդեցություն: Ներկայացվող հետազոտության նպատակն է հանդիսացել ուսումնասիրել ամիտաթթու տաուրինի հականոցիցեպտիվ և հակաբորբոքային հատկությունները Կովկասյան գյուրգայի թույնի ազդեցության պարազայում: Այս հետազոտության մեջ կիրառվել են նաև ոչ պակաս հետաքրքրություն ներկայացնող N-ացիլ ամիդների դասին պատկանող մի շարք նյութեր, որոնք հանդիսանում են ֆիզիոլոգիապես ակտիվ միացությունների և ճարպաթթուների կոնյուգատներ, ընդգրկված են էնդոկանաբիոսիդների շարքում: N-ացիլ ամիդների դասին են պատկանում նաև տաուրինի և ճարպաթթուների տարբեր կոնյուգատները:

Տվյալ աշխատանքում առաջին անգամ կատարվել են Կովկասյան գյուրգայի, Հայկական իժի (*Montivipera raddei raddei*), Ռասսելի իժի (*Vipera russelli russelli*) և Խայտաբդետ կարիճի (*Buthus eupeus*) թույների նոցիցեպտիվ ազդեցության հետազոտությունները մկների մոտ: Համաձայն ստացված տվյալների գյուրգայի թույնը համեմատած Հայկական իժի և Ռասսելի իժի թույներին, դրսևորում է ավելի ուժգին նոցիցեպտիվ էֆեկտ: Հետազոտության արդյունքները վկայում են, որ գյուրգայի թույնի Ա2 ֆոսֆոլիպազը խաղում է անմիջական դեր մկների մոտ սպոնտան նոցիցեպտիվ ակտիվության առաջացման մեջ: Այդ մասին վկայում է այն փաստը, որ Ա2 ֆոսֆոլիպազի ակտիվության բեկանումը բերում է գյուրգայի թույնի ազդեցության կրճատմանը 64.7%-ով:

Ա2 ֆոսֆոլիպազի ակտիվության բեկանումը կիսով չափ թուլացնում է (44.1%-ով) նաև թույնի տոքսիկությունը: «Տաք սալիկ» մեթոդի միջոցով բացահայտվել է, որ թույնի պրոտեազային ակտիվության բեկանումը առաջացնում է մկների մոտ նույն ռեակցիան, ինչպիսին էր ինտակտ խմբում, որը մատնանշում է ջերմային գերզգայության առաջացման մեջ թույնի տվյալ բաղադրիչների կարևորությունը: Տաուրինի հակացավային ազդեցության հետազոտությունները ցույց են տվել, որ մկան էտնի թաթի մեջ գյուրզայի թույնի ներարկումից 15 րոպե առաջ տաուրինի ներորովայնային ներարկումը (100 մգ/կգ), բերում է թույնի նոցիցեպտիվ ակտիվության նվազմանը 1.9 անգամ: Տաուրինի ազդեցությունը շատ նման է գյուրզայի թույնի ազդեցության այն դեպքին, երբ բեկանված է Ա2 ֆոսֆոլիպազի ակտիվությունը: Եվ Ա2 ֆոսֆոլիպազի ճնշումը, և տաուրինի ներարկումը բերում էին մկների նոցիցեպտիվ պատասխանի իջեցմանը թույնի ազդեցության առաջին փուլում (0-5 րոպե ինտերվալ) մոտ 1.5 անգամ, իսկ երկրորդ փուլում (26-30 և 36-45 րոպե ինտերվալներ) 4-5 անգամ: Այսպիսով, թույնի ազդեցության թուլացումը տաուրինով կարող է կապված լինել առախիդոնաթթվի մետաբոլիզմի և պրոստագլանդինների սինթեզի հետ: Տվյալ ենթադրությունը հաստատվում է նաև այն փաստով, որ ստուգիչ հակաբորբոքային պատրաստուկները (մասնավորապես դեքսամետազոնը), որոնք ազդում են COX-1/COX-2 ֆերմենտների վրա և իջեցնում են թույնի ազդեցության ուշ փուլը (2 փուլ): Կատարված աշխատանքում ցույց է տրվել առնետների արյան շիճուկի մեջ թույնի ներորովայնային ներարկումից 60 րոպե անց TNF- α , IL-6 և IL-8 ցիտոկինների մակարդակի հավաստի փոփոխություն: Ցույց է տրվել նաև, որ տաուրինը գյուրզայի թույնի հետ միաժամանակ ներարկումից 60 րոպե անց բերում է TNF- α -ի մակարդակի նորմալացմանը (նվազում է 28.6%-ով), զգալի իջեցնում է IL-8-ի (91.3%-ով) և բարձրացնում է IL-6 -ի (36.5%-ով) կոնցենտրացիաները առնետների արյան շիճուկում: Ցույց է տրվել, որ միջինասիական կոբրայի թույնը, փոքր չափաբաժիններով, ցուցաբերում է վառ արտահայտված հականոցիցեպտիվ հատկություն գյուրզայի թույնի դեմ (թուլացնում է ազդեցությունը 71.7%-ով): Կոբրայի թույնի և տաուրինի համատեղ ներարկումը տվել է գումարային էֆեկտ (մինչև 83% թուլացում), որը անուղղակիորեն փաստում է նրանց ազդեցության մեխանիզմների տարբերության մասին: Հետազոտությունների արդյունքները այն մեր վարկածի մասին, որ էկզոգեն տաուրինը կարող է գյուրզայի թույնի դերիվատների հետ *in vivo* փոխազդեցության հետևանքով մեծաքանակ թվով կոնյուգատներ առաջացնել, ցույց են տվել որ N-առախիդոնոիլ տաուրինը (AA-Tau) և N-օլեիլ տաուրինը (OL-Tau) կարող են ունենալ զգալի մասնակցություն տաուրինի հականոցիցեպտիվ էֆեկտի մեջ թույնի ազդեցության 2-րդ փուլում: Համաձայն ստացված տվյալների, AA-Tau և OL-Tau-ը 5 մգ/կգ չափաբաժինով բերում են թույնի նոցիցեպտիվ ազդեցության նվազմանը համապատասխանաբար 31.5 և 22.6%-ով: Կատարվել է նաև մի շարք այլ էնդոկանաբիոտիկ նյութերի, N-ացիլ ամիդների, այդ թվում անանդամիդի և N-արախիդոնոիլ դոֆամինի թեստավորումներ: Առավել արտահայտված անալգետիկ հատկությունով օժտված էր «հիբրիդային» Առվանիլը N-արախիդոնոիլ վանիլինը, որը թուլացնում էր թույնի ազդեցությունը 71.7%-ով: Ստացված տվյալները թույլ են տալիս դիտարկել տուրինը և որոշ նշված կոնյուգատները իրեն հեռանկարային միացություններ գյուրզայի թույնի դեմ հակացավային դեղորայք ստանալու նպատակով:

ANTINOCICEPTIVE EFFECT OF SULFURIC AMINO ACID TAURINE AGAINST
LEVANTINE VIPER VENOM

SUMMARY

The aim of present work was investigation of anti-nociceptive effects of certain physiologically active substances, such as taurine and its conjugates with fatty acids, cluster of N-acyl amids and anti-inflammatory drugs (analgin, diclofenac, dexametasone) against Levantine viper venom painful action. Destructive properties of vipers' venoms are well known, but they also have modulative action on nociceptive processes too. The most widespread species of vipers in Armenia is Caucasian Levantine viper (*Macrovipera lebetina obtusa*, MLO), which bites are very painful. The main analgesic and anti-inflammation remedies used for pain relief have many undesirable side effects. So, it is of modern scientific and medical interest to research and develop new anti-nociceptive preparations without side effects. Anti-nociceptive properties are attributes not only of analgesic drugs, but of some physiologically active substances, which are involved in metabolic processes of perception and transfer of nociceptive information. One of them is free, sulfonic amino acid taurine. Even in comparately high doses exogenic taurine is not toxic. In present study the antinociceptive and anti-inflammatory effects of taurine versus Caucasian Levantine viper venom action were investigated. We have also studied very intriguing class of molecules – N-acyl amids – the conjugates of fatty acids and physiologically active substances, which are members of endocannabinoid family. The taurine conjugates with various fatty acids also belong to N-acyl amids.

In present work nociceptive action of Caucasian Levantine viper's, Armenian viper's (*Montivipera raddei raddei*), Russell's viper's (*Vipera russelli russelli*), and also Caucasian scorpion's (*Buthus eupeus*) venoms was originally investigated in mice. According to obtained data, Levantine viper's venom has greater nociceptive effect compared to Armenian and Russell's viper venoms. The findings suggest a direct role of Levantine viper's venom phospholipase A2 in the development of spontaneous nociceptive activity in mice. The inhibition of phospholipase A2 led to an overall reduction of venom nociceptive effect by 64.7%. Moreover, phospholipase A2 inhibition significantly reduced venom toxicity about 2 times (by 44.1%). The "Hot Plate" test revealed that the inhibition of venom protease activity cause the reaction of mice close to the control group, which underlines the importance of these components in development of increased sensitivity to thermal stimulation. The study of taurine's antinociceptive properties showed that its intraperitoneal injection (100 mg/kg) 15 min prior to Levantine viper's venom injection into paw reduced venom nociceptive action about 1.9 times. The taurine action was very close to the results obtained during phospholipase A2 inhibition. Both, the PLA2 inhibition and taurine pretreatment brought to the reduction of venom nociceptive action in Phase 1 (0-5 min interval) and Phase 2 (26-30 and 36-45 min) – 1.5 and 3-4 times, respectively. Therefore, the weakening of venom's action by taurine may be associated with the metabolism of arachidonic acid and prostaglandin synthesis. This hypothesis is supported by the fact that the control anti-inflammatory drugs (in particular dexamethasone) acting on COX-1/COX-2 enzyme, similarly reduced the later stages of venom nociceptive action (Phase 2). Present study

showed the significant changes in rats' serum levels of TNF- α , IL-6 and IL-8 after 60 min of Levantine viper venom's intraperitoneal injection. It has been also demonstrated that taurine, 60 min after its simultaneous intraperitoneal injection with Levantine viper venom, normalized levels of TNF- α (reduced by 28.6%), markedly decreased levels of the chemokine IL-8 (by 91.3%) and increased the concentration of IL-6 (by 36.5%) in rats' serum. It was shown that low doses of the Central Asian cobra venom had pronounced antinociceptive effect against Levantine viper venom painful action (decreased by 71.1%). The "additive" effect (further reduction to 83%) of taurine and cobra venom co-injection was obtained, which indirectly proofed the differences in their mechanisms of antinociceptive action. The results of the study concerning the verification of hypothesis of taurine conjugates formation due to in vivo interaction of Levantine venom's derivatives and exogenic taurine, showed that N-arachidonoyl taurine (AA-Tau) and N-oleoyl taurine (OL-Tau) may have great contribution to taurine's antinociceptive effect in Phase 2 of venom action. According to the data, AA-Tau and OL-Tau at a dose of 5 mg/kg led to a reduction of the nociceptive action of venom by 31.5% and 22.6%, respectively. We have also tested some other endocannabinoids (N-acyl amides), including anandamide and N-arachidonoyl dopamine. The greatest analgesic effect had a "hybrid" Arvanil – N-arachidonoyl vanillin, which weakened the venom effect by 71.7%. The results of the study allow us to propose the taurine and some of above mentioned conjugates as perspective candidate molecules for the development of analgesic drugs against the Levantine viper's venom.

