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

ԴԱՐԲԻՆՅԱՆ ԱՆՆԱ ԱՇՈՏԻ

ԳՅՈՒՐՋԱՅԻ ԹՈՒՅՆԻ ԴԵՄ ՏԱՈՒՐԻՆԻ ՀԱԿԱՏՈՔՍԻԿ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՄԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐԸ

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

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

Երևան – 2014

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

ДАРБИНЯН АННА АШОТОВНА

МЕХАНИЗМЫ АНТИТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ТАУРИНА ПРОТИВ ЯДА ГЮРЗЫ

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степеи
кандидата биологических наук
по специальности 03.00.09.- «Физиология человека и животных»

Ереван – 2014

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՝ կ.գ.դ., պրոֆեսոր Ջ.Ս.Սարգսյան
կ.գ.թ. Ս.Հ. Բաղդասարյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Խ.Աբովյանի անվան հայկական պետական մանկավարժական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2014թ. դեկտեմբերի 19-ին, ժամը 13:00-ին, ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտում, Փորձարարական կենսաբանության 042 մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ, 0028, ք. Երևան, Օրբելի եղբ., 22):

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

Սեղմագիրն առաքված է 2014թ. նոյեմբերի 19-ին:
042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենս. գիտ. թեկնածու՝ Գ.Մ. Մկրտչյան

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

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

Официальные оппоненты: д.б.н., профессор Дж.С. Саркисян
д.б.н. С.А. Багдасарян

Ведущая организация: Армянский государственный педагогический университет им. Х. Абовяна

Защита диссертации состоится 19-ого декабря 2014 г. в 13:00 часов на заседании специализированного совета 042 Экспериментальной биологии, в Институте физилогии им. Л.А.Орбели НАН РА (РА, 0028, г. Ереван, ул. бр.Орбели, 22).

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

Автореферат разослан 19-ого ноября 2014г.

Ученый секретарь специализированного совета 042,
кандидат биол. наук Г.М. Мкртчян

ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ

Հետազոտության արդիականությունը: Հայտնի է, որ թունավոր օձերի խայթոցները հաճախ ուղեկցվում են ծանր հետևանքներով և անգամ մահացու ելքով: Օձերի խայթոցները վտանգավոր են ոչ միայն տրոպիկական գոտիների այլև զարգացած երկրների բնակիչների համար (Warrell D., 2010; Williams D. et al., 2010; Yasunaga H. et al., 2011; Chidananda P. et al., 2013):

Յուրաքանչյուր տարի մոտավորապես 2,5 մլն մարդ է տուժում օձերի խայթոցից որոնցից 100000-ը ունենում է մահացու ելք (Koh D. et al., 2006; Trape J. et al., 2001; Theakston R. et al., 2003):

Կովկասի, Անդրկովկասի տարածքում ամենից հաճախ հանդիպում են իժերը: Շատ ավելի տարածված են սովորական, տափաստանային, կովկասյան և պնչեղ (մեծադունչ) իժերը (Орлов Б. и др., 1990):

Անդրկովկասի տարածքում ամենավտանգավորներից մեկը գյուրզան է (*Macrovipera lebetina obtusa*), որին մոտ ենթատեսակները հանդիպում են նաև Հյուսիսային Աֆրիկայի տարածքում (*M. l. transmediterranea*), Միջին Ասիայում (*M.l. turanica*) և այլն (Орлов Б. и др., 1990; Sanz L. et al., 2008.):

Թույնի ազդեցությամբ ծանր դեպքերում զարգանում է նաև շոկային վիճակ, որին նպաստում է սրտային անբավարարությունը, երակային արյան ծավալի քչացումը, արյան խտացումը ինչպես նաև ԿՆՀ-ի ֆունկցիաների խանգարումը: Մահ կարող է առաջանալ սիրտանոթային կամ պարենխիմատոզ օրգանների սուր անբավարարությունից (Osipov A. et al., 2012):

Ուստի կարևորվում է թունավորման դեպքում հակաթունային ազդեցությամբ օժտված նյութերի կիրառումը:

Գոյություն ունի հակաթույնային պայքար՝սպեցիֆիկ և ոչ սպեցիֆիկ նյութերի միջոցով: Սպեցիֆիկ միջոցներին են դասվում բուժիչ իմունոլոգիական շիճուկները, որոնք ստացվում են կենդանիների իմունացումից հետո որոշակի թույներով, և սույնով սպեցիֆիկ են այդ թույնի հանդեպ: Օրինակ, գյուրզայի դեպքում՝ սպեցիֆիկ միջոց է մոնովալենտ բուժական իմունոլոգիական շիճուկը՝ «Անտիգյուրզին»-ը, կամ պոլիվալենտ բուժական իմունոլոգիական շիճուկները , որոնք պարունակում են նաև անտիգյուրզին**:** Սակայն շիճուկները բավական ալերգիկ նյութերի հավաքածու են, որը պետք է օգտագործել զգուշությամբ,ներարկումը պետք է կատարվի բուժական անձնակազմի կողմից (Stone S. et al., 2013; Isbister G. 2010):

«Անտիգյուրզին»-ը նաև հանդիսանում է բավականին բարձր գին ունեցող դեղորայք և պահանջում է պահպանման հատուկ պայմաններ:

Բացի այդ շիճուկները դասվում են «որբ դեղերի» (orphan drugs) շարքին, այսինքն հազվագյուտ հիվանդությունների դեմ մշակված դեղերի շարքին (Henkel J. et al., 1999, Armstrong W. et al., 2010, Illingworth P. et al., 2004):

Այդ պատճառով մեծ կիրառելիություն ունեն նաև ոչ սպեցիֆիկ պայքարի միջոցները: Ոչ սպեցիֆիկ նյութերը և հակաթույները հանդիսանում են միջոցներ, որոնք կամ չեզոքացնում են թույնի բաղադրիչներին, կամ կանխում և թուլացնում են թույնի ազդեցության ընթացքը և հետևանքները: Օրինակ, հեպարինը (որպես հակամակարդիչ նյութ, որը կանխում է համատարած ներանոթային արյան մակարդման սինդրոմի զարգացումը), կորտիզոլը, հակահիստամինային

պրեպառատները, հակաօքսիդանտները, ֆիտոպրեպառատները և մի շարք կենսաբանորեն ակտիվ նյութեր (Rostelato-Ferreira S. et al., 2010; Paul V. et al., 2007; Hage-Melim L. et al., 2013; Soares A. et al., 2005, Tin Na Swe et al., 1992, Paes Leme A. et al., 2009; Carvalho B. et al., 2013):

Վերջին տարիներին հետազոտողների ուշադրությունը մեծացել է հատկապես տաուրինի հակատոքսիկ ազդեցության նկատմամբ:

Հանդիսանալով ազատ, ոչ սպիտակուցային ամինաթթու, տաուրինը շրջանառվելով օրգանիզմում և լինելով ունիվերսալ, ֆիզիոլոգիապես ակտիվ նյութ, մասնակցում է ոչ միայն օրգանիզմի կարևոր գործընթացների կարգավորմանը այլ նաև ցուցաբերում է խիստ արտահայտված հակատոքսիկ ազդեցություն որոշակի քսենոբիոտիկների հանդեպ (Jacobsen J. et al., 1968; Kuhn-Nentwig L. et al., 1998; Ye H. et al., 2013; Ma H. et al., 2012; Ueno T. et al., 2007; Flora S. et al., 2013; Deng Y. et al., 2013; Akay C. et al., 2013; Yang Q. et al., 2013): Տեսականորեն և գործնականորեն ծայրահեղ անհրաժեշտ է ուսումնասիրել տաուրինի հակատոքսիկ ներուժը կենդանական թույների և մասնավորապես գյուրզայի թույնի դեմ և հետազոտել վերջինիս անտիդոտային մեխանիզմները:

Աշխատանքի նպատակը և խնդիրները: Ներկայացվող աշխատանքի նպատակն է եղել ուսումնասիրել և պարզել թե տաուրինը կարող է հանդիսանալ իբրև ոչ սպեցիֆիկ հակատոքսիկ միջոց գյուրզայի թույնի դեմ և բացահայտել նրա հակատոքսիկ ազդեցության մեխանիզմները:

Նպատակի իրականացման համար առաջադրվել են հետևյալ խնդիրները

1. Պարզել թե ինչ ազդդեցություն է ունենում տաուրինը օրգանիզմում ներորովայնային ներարկման ժամանակ և ճշտել տաուրինի օպտիմալ դոզաները գյուրզայի թույնի դեմ հակատոքսիկ էֆեկտ ստանալու նպատակով (տոքսիկոլոգիական հետազոտություններ):
2. Իրականացնել *in vitro* պայմաններում գյուրզայի թույնի դեմ տաուրինի հակատոքսիկ ազդեցության հետազոտություններ կապված թույնի զանազան ֆերմենտների ակտիվության հետ:
3. Տաուրինի հակատոքսիկ ազդեցության մեխանիզմների վերծանումը մազանոթային համակարգի մորֆոհիստոլոգիական հետազոտությունների միջոցով (հիստոքիմիական և մորֆոլոգիական ուսումնասիրություններ):
4. Ուսումնասիրել տաուրինի հակամակարդիչ հատկությունները ենթամաշկային մազանոթների համակարգի վրա:

Աշխատանքի գիտական նորույթը: Աշխատանքի մեջ առաջին անգամ տաուրինը ուսումնասիրվել է որպես գյուրզայի թույնի դեմ ոչ սպեցիֆիկ հակատոքսիկ միջոց: Բացահայտվել է տաուրինի բարենպաստ պաշտպանական ազդեցությունը արյան անոթների վրա հեմոռագիկ թույնի քայքայիչ ազդեցության դեպքում: Ինչպես նաև հայտնաբերվել է նրա հակակոագուլյացիոն հատկությունների բարենպաստ ազդեցությունը օրգանիզմում: Ցույց է տրվել կովկասյան գյուրզայի թույնի քայքայիչ ազդեցությունը մազանոթների ցանցի վրա:

Բացի այդ հետազոտվել է մի շարք կենդանական թույների ազդեցությունը առնետի ուղեղի մազանոթային ցանցի վրա և գնահատվել է վնասվածքների համեմատական աստիճանը ուղեղի տարբեր բաժիններում: Բացահայտվել է տաուրինի անմիջական

անոթպաշտպանիչ դերը գյուրզայի թույնի Zn-պարունակող Ca-կախյալ մետալոպրոտեինազայի անոթքայքայիչ ազդեցության ժամանակ և հակամակարդիչ հատկությունը թույնի համատարած ներանոթային արյան մակարդման ախտանիշի դեմ:

Հետազոտության գիտա-գործնական նշանակությունը: Տաուրինի անոթպաշտպանիչ և հակամակարդիչ հատկությունների բացահայտումը գյուրզայի թույնի դեմ ունի կարևոր գիտա-գործնական նշանակություն: Տաուրինի անոթների հանդեպ պաշտպանական մեխանիզմները հանդիսանում է կարևոր գիտական փաստ, որը տեսականորեն և գործնականորեն կիրառելի է բժշկության տարբեր բնագավառներում:

Ելնելով այն հանգամանքից, որ հակաթույները մասնավորապես «Անտիգյուրզին»-ը ստեղծում է բարձր ալերգիկ ֆոն և պահանջում է պահպանման և ներարկման հատուկ պայմաններ, գյուրզայի թույնի դեմ տաուրինի որպես ոչ սպեցիֆիկ պայքարի միջոցի կիրառումը ունի կարևոր գործնական և տնտեսական նշանակություն:

Հետազոտության արդյունքները կարող են հիմք ծառայել, որպիսի տաուրինը կիրառվի որպես կենսաբանական ակտիվ հավելում գյուրզայի խայթոցի դեմ, իբրև նախաբժշկական առաջին օգնության միջոց բժշկական հաստատություններից հեռու բնակավայրերում և հիմնարկներում, ռազմիկների, երկրագետների, զբոսաշրջիկների, տեղի բնակչության և այլոց համար մինչ նրանք կստանան մասնագիտացված բուժական օգնություն: Տաուրինի կիրառումը իբրև հակաթույն գյուրզայի խայթոցի դեմ կարելի է առաջարկել իբրև հայտնի դեղամիջոցի կիրառության նոր ոլորտ:

Աշխատանքի նախապաշտպանությունը և և հրատարակումները:

Ատենախոսության հիմնական դրույթները զեկուցվել են Երիտասարդ գիտնականների գիտաժողովում «Մոլեկուլային և բջջային կենսաբանության զարգացման հեռանկարները» (Երևան, 5-6 մայիսի, 2008); Կենսատեխնոլոգիայի և առողջության-3 շրջանավարտների միջազգային գիտաժողով (Biotechnology and Health-3 & DAAD Alumni seminar, Երևան, 15-17 հոկտեմբեր, 2009); Ակադ. Վ.Բ. Ֆանարջյանի ծնն. 80-ամյակին նվիրված միջազգային գիտաժողովում «Նյարդային համակարգի ինտեգրատիվ գործունեության և ճկունության արդիական խնդիրները» (Երևան, 10-13 հոկտեմբեր, 2012); Ակադ. Լ.Ա. Օրբելու ծնն. 130-ամյակին նվիրված հոբելյանական միջազգային գիտաժողովում «Օրգանիզմի գործունեության կարգավորման ֆիզիոլոգիական մեխանիզմները» (Երևան 22-24 սեպտեմբեր , 2013); Ուսանողների, ասպիրանտների և երիտասարդ գիտնականների միջազգաին գիտաժողովում «Լոմոնոսով-2013» (Մոսկվա, 8-13 ապրիլ, 2013); Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտում կայացած “Նյարդաբանության և կենսաբանական հոգեբուժության” երրորդ միջազգային հոբելյանական գիտաժողովում, թեզիսների ժողովածու (Երևան 22-24 սեպտեմբեր, 2013); Եվրոպական Ֆեդերացիայի 8-րդ կոնգրես (8th Congress of the Europesn Federation of IASP Chapters, Ֆլորենցիա, 9-12 հոկտեմբեր, 2013):

Ատենախոսության նախապաշտպանությունը տեղի է ունեցել ՀՀ ԳԱԱ Լ.Օրբելու անվ. ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի գիտական խորհրդի ՝ 05.11.2014թ կայացած թիվ 12 ընդլայնված նիստում:

Տպագրություններ: Սույն հետազոտությունների արդյունքները ներկայացված են 11 տպագրություններում:

Աշխատանքի ծավալն ու կառուցվածքը: Ատենախոսությունը շարադրված է 122 տպագրական էջում, ներառելով 6 աղուսյակ և 41 նկար: Բաղկացած է՝ բովանդակությունից, օգտագործված հապավումների ցանկից և նրանց բացատրություններից, ներածությունից, գրական ակնարկից օգտագործված նյութերից և մեթոդներից, հետազոտությունների արդյունքներից և քննարկումներից, եզրակացություններից և մեջբերված 363 գրականության աղբյուրների ցանկից:

2. ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՆՅՈՒԹԵՐՆ ՈՒ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

Հետազոտությունները կատարվել է ՀՀ ԳԱԱ ակադ. Լ.Ա. Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի Ֆիզիոլոգիապես Ակտիվ նյութերի Զտման, Սերտիֆիկացման և Ստանդարտիզացման լաբորատորիայում:

2.1. Օգտագործված կենդանիներ և նյութեր

Մեր գիտափորձերում օգտագործված թույնը ստացվել է կովկասյան գյուրզա տեսակին պատկանող օձի մեխանիկական կթմամբ («ԳԷԲ ԵՎ ՍՍ» ՍՊԸ): Թույնը չորացվել է չորացուցիչի մեջ վակուումում՝ սիլիկագելի վրա -0,9 մթն ճնշման պայմաններում մինչև բյուրեղացումը:

In vivo փորձերի համար օգտագործվել է ալբինոս, լաբորատոր, սեռահասուն արու առնետներ 200-220գ քաշով 228 առանձնյակ և ալբինոս, լաբորատոր, սեռահասուն արու մկներ 25-30գ քաշով 168 առանձնյակ: Գյուրզայի թույնի մահացու չափաբաժնի 50 %-ը (ՄՉ$_{50}$) որոշվել է Բերենսի մեթոդով (Правдин Н., 1973): Փորձերի վերջում գոյատևած կենդանիները հետագա փորձերում չեն օգտագործվել:

Տաուրինը տրամադրել է հայկական ‹‹Լիկվոր դեղագործական ընկերություն›› ՍՊԸ-ն:

Վիճակագրական մշակումները կատարվել են «GraphPad Prism» ծրագրով, հաշվարկվել է տվյալների միջինները և ստանդարտ շեղումները:

2.2. Տոքսիկոլոգիական հետազոտություններ:

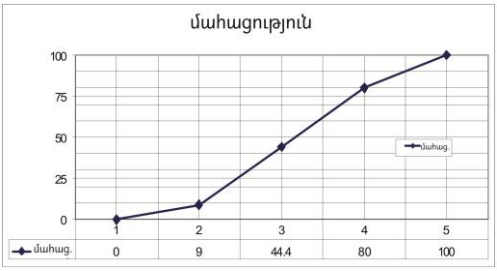
Կենդանական թույնի տոքսիկության ՄՉ$_{50}$-ի Բերենսի մեթոդով որոշման համար մկներից կազմվել է 5 խումբ: Յուրաքանչյուր խմբում վեցական կենդանի: Ենթափորձային կենդանիներին ներարկվել է՝ 1մգ/կգ, 2գ/կգ, 3մգ/կգ, 4մգ/կգ և 5մգ/կգ չափաբաժիններով թույն համապատասխանաբար խմբերին: 24 ժամ անց իրականացվել է մկների մահացության գրանցում ըստ խմբերի և փորձի արդյունքների մշակում, որը կատարվում է համաձայն Բերենսի կողմից առաջարկած տրամաբանական դիրքորոշմանը. եթե կենդանին մահանել է թույնի փոքր չափաբաժնից, ապա այն կմահանա նաև բարձր չափաբաժնից և հակառակը, եթե կենդանին գոյատևել է թույնի մեծ չափաբաժնի ներարկումից, ապա այն կգոյատևի նաև թույնի փոքր չափաբաժնի ներարկումից: Ի հեճուկս, Բերենսը առաջարկել է հաշվել թույնի ամենաքիչ չափաբաժնից մահացած կենդանիների թիվը մինչև թույնի ամենամեծ չափաբաժնից մահացած կենդանիների թիվը, ինչպես նաև հաշվել այն կենդանիների թիվը, որոնք գոյատևել են թույնի ամենամեծ չափաբաժնից մինչև ավելի քիչ չափաբաժինները՝ աղուսյակ 1:

Աղուսյակ 1.

Տոքսիկութայն ՄՉ50 -ի որոշումը Բերենսի մեթոդով

Թույնի չափաբաժինը	Արդյունքներ՝ մահ./ գոյ.	Հաճախ. կուտակում	Մահ. %
1 մգ/կգ	0/6	0/16	0
2 մգ/կգ	1/5	1/11	9
3 մգ/կգ	3/3	4/9	44.4
4 մգ/կգ	4/2	8/10	80
5 մգ/կգ	6/0	14/14	100

Ըստ աղուսյակի տվյալների կառուցվում է գրաֆիկ, նկար 1:



Նկար 1. Տոքսիկութայն ՄՉ50 -ի որոշումը Բերենսի մեթոդով

2.3. Օձի թույնի բաղադրիչների էնզիմային ակտիվության որոշում

Կաթի մակարդման միջոցով թույների կոագուլազային (կազեինոլիտիկ) ակտիվության որոշման մեթոդ

Սրվակներում լցվում է թարմ, խանութի կաթ: Համապատասխան խմբում ավելացվում է թույն 1:5000 հարաբերությամբ, իսկ ստուգիչ խմբին ոչինչ չի ավելցվում: Սրվակների պարունակությունը լավ խառնելուց հետո սրվակները տեղադրել ջրաբաղնիքի մեջ 38°C ջերմաստիճանում 30 րոպե, որից հետո եթե թույն պարունակող սրվակներում կաթը մակարդվում է, ապա դա նշանակում է, որ թույնը օժտված է կոագուլազային ակտիվությամբ: Ստուգիչ խմբի կաթը պետք է մնա հեղուկ վիճակում այլապես կաթը հին է և պիտանի չէ (Восканян А. и др., 2003):

Թույնի ֆոսֆոլիպազայի ակտիվության որոշման մեթոդ

Թարմ ձվի սպիտակուցից առանձնացված դեղնուցը խառնվում է ֆոսֆատային բուֆերի (PH=7,4) հետ 1:1 հարաբերությամբ: Խառնուրդը լցվում է սրվակների մեջ, այնուհետև ավելացվում է թույնը 1:5000 հարաբերությամբ: Ստացված խառնուրդը 30 րոպե ինկուբացվում է 38°C ջերմաստիճանում ջրաբաղնիքի վրա: Այնուհետև խառնուրդը տեղափոխվում է եռացող ջրի մեջ 15 րոպե ժամանակով: Արդյունքում եթե թույն ավելացված սրվակներում խառնուրդը չի մակարդվում ապա թույնի ֆոսֆոլիպազայի ակտիվությունը ակնհայտ է: Ստուգիչ խմբի սրվակների պարունակությունը, որտեղ ԴՖԲ խառնուրդին ոչինչ չի ավելացվում և մակարդվում է (Солодухо И. и др. 1967, մոդիֆիկացված մեր լաբորատորիայում՝ Восканян А., 1994):

2.4. Մազանոթային համակարգի վնասվածքի հիստոքիմիական հետազոտություններ՝ կալցիում ադենոզին եռֆոսֆատային հիստոքիմիական մեթոդ

Այս մեթոդը (Чилингарян А., 1986) թույլ է տալիս մանրադիտակով տեսնել մազանոթային ցանցի պարզ և ցայտուն պատկերը: Հետազոտվող օբյեկտ են հանդիսացել առնետների գլխուղեղը և երիկամները: Կենդանիները քնեցվում են նեմբուտալային նարկոզով (40մգ/կգ), որից հետո կատարվում է դեկապիտացիա և հնարավորինս արագ հեռացվում են օրգանները՝ տվյալ դեպքում երիկամները և գլխուղեղը: Օրգանները կտրել 2-3 սմ հաստությամբ և տեղադրել 5%-ոց ֆորմալինի լուծույթի մեջ՝ 24 ժամ, սենյակային ջերմաստիճանում: Այնուհետև ֆիքսված օրգանները շերտատել 90 մկմ հաստությամբ: Ֆիքսված օրգանի շերտերը՝ հավաքել թորած ջրի մեջ, որից հետո տեղափոխել՝

1. ինկուբացիոն խառնուրդի մեջ, որը ունի հետևյալ բաղադրությունը. 4մլ 4N 25% ամոնիակի լուծույթ + 2մլ 0.1M կալցիումի քլորիդի լուծույթ + 2մլ ԱԵՖ «Ռեանալ» ֆիրմայի) լուծույթ (0.1M թարմ պատրաստած ադենոզին 5 եռֆոսֆորական թթվի երկնատրիումական աղի լուծույթ) + 12մլ թորած ջուր: Ինկուբացիան տևում է 1 ժամ 30 րոպե, սենյակային ջերմաստիճանում:
2. թորած ջրով լվացում 2-5 րոպե
3. կապարի խառնուրդ, որը պատրաստվում է հետևյալ կերպ՝100մլ թորած ջրին ավելացնել 2 կաթիլ քացախաթթու, հետո ավելացնել 2գ. քիմիապես մաքուր քացախաթթվային կապար, 10մլ 1M ացետատային բուֆեր (PH=6.2) և 15մլ 8%-ոց քացախաթթվային ամոնիումի լուծույթ: Տվյալ խառնուրդում շերտերը մնում են 1 ժամ 30 րոպե:
4. թորած ջրով լվացում 2-5 րոպե
5. 1%-ոց սուլֆոսալիցիլաթթվի լուծույթ, 3-10 րոպե
6. թորած ջրով լվացում 2-5 րոպե
7. 2-5%-ոց ծծմբային նատրիումի լուծույթ 1-3 րոպե
8. թորած ջրով լվացում 2-5 րոպե
9. շերտերը հավաքել առարկայակիր ապակիի վրա, չորանալուց հետո ծածկել, ծածկապակիով:

Օրգանների շերտակտրվածքների միկրոնկարները վերծանվել են թվային ակնապակու (օկուլյար) FMA050 AmScope UCMOS09000KPB միջոցով և x6, x20 и x40 ոսպնյակների օգնությամբ:

Ընդհանուր առմամբ պատրաստվել է 330 պատրաստուկ:

2.5. Մակրոհիստոլոգիական հետազոտությունների մեթոդ

Ենթափորձային կենդանիները քնեցվել են նեմբուտալային նարկոզով (40մգ/կգ) այնուհետև կենդանու մեջքը մազահեռացնել դէպիլացիոն «Veet» (Reckitt Benckiser) քսուկով՝ համապատասխան այդ քսուկի օգտագործման եղանակի: Մազահեռացված մեջքի 2 կողմից ենթամաշկային ուղիով ներարկել փորձարկվող նյութը կամ թույնը: Անհրաժեշտ ժամանակահատված անց ներարկում կատարված հատվածից անջատել կենդանու մաշկը և ներսի կողմից դիտարկել փոփոխությունները:

3. ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐԸ ԵՎ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄԸ

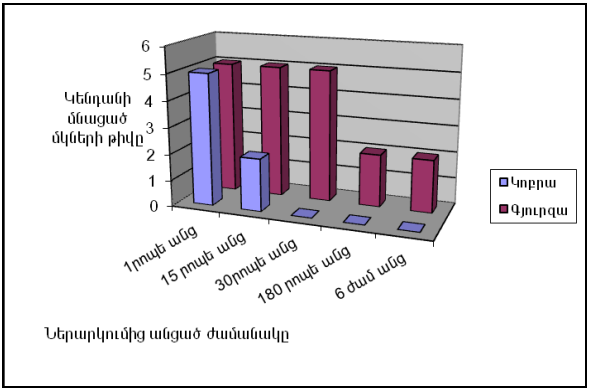
3.1.1. Տաուրինի հակատոքսիկ ազդեցության օպտիմալ չափաբաժնի որոշումը

Ինչպես հայտնի է գրականության տվյալներից (Ownby C. et al., 1990; Osipov A. et al., 2012; Adukauskienė D. et al., 2011) օձերի թույները հիմնականում ազդում են օրգանիզմի երկու կարևորագույն՝ արյան և նյարդային համակարգերի վրա: Ըստ այդմ էլ ենթաբաժանվում են համապատասխանաբար հեմատոտրոպների և նյարդատրոպների: Հաշվի առնելով տաուրինի գործունեությունը արյունատար համակարգում մասնավորապես նրա բարձր պարունակությունը թրոմբոցիտներում (Nieminen M. et al., 1996) և լեյկոցիտներում (Schuller-Levis G. et al., 2004; Wang L. et al., 2009; Marcinkiewicz J. et al., 2014) ինչպես նաև արյան մակարդման գործընթացին անհրաժեշտ վիտամին K - ի՝ փոխադրման գործում տաուրինի մասնակցությունը (Petrosian A. et al., 2000), որոշեցինք կատարել նախնական փորձեր գյուրզայի (*Macrovpera lebetina obtusa*) և միջինասիական կոբրայի (*Naja naja oxiana*) թույնի օգտագործմամբ, և պարզել թե տաուրինը ունի որևէ հակատոքսիկ ազդեցություն և եթե ունի ապա, որ ուղղության վրա է ազդում:

Մի խմբին ներորովայնային ուղիով ներարկվեց գյուրզայի թույն, մյուս խմբին նույն ճանապարհով միջինասիական կոբրայի թույն: Չափաբաժինները 2.5 անգամ գերազանցում էին համապատասխան թույնի ՄՉ50-ը: Տաուրինը ներարկվել է 100մգ/կգ չափաբաժնով:

6 ժամ անց կոբրայի թույն ստացած խմբում մահացությունը կազմում է 100% իսկ գյուրզայի թույն ստացած խմբում՝ 66.6%, նկար 2:

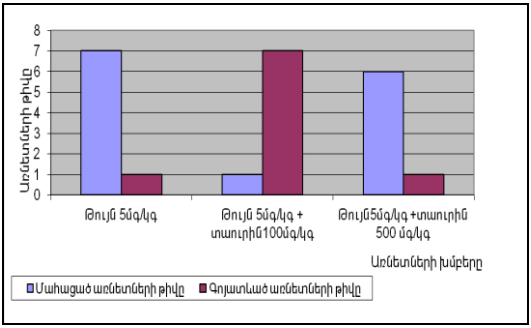
Տաուրինի ազդեցության տարբերությունը գյուրզայի և կոբրայի թույների վրա հնարավորություն է տալիս կողմնորոշվել տաուրինի պաշտպանիչ ազդեցության մեխանիզմների բացահայտման ուղին:



Նկար 2. Գյուրզայի և կոբրայի թույների ներարկմից հետո կենդանի մնացած մկների թիվը

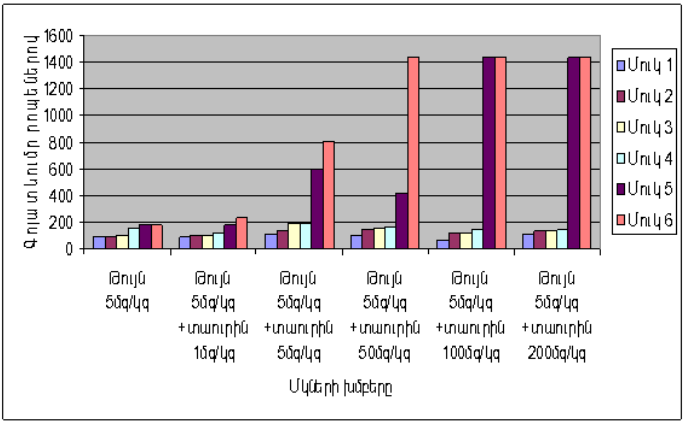
Այն փաստը, որ տաուրինը լավ արդյունք է ցույց տալիս ընդդեմ գյուրզայի թույնի և գործնականում չի օգնում կոբրայի թույնի դեպքում, խոսում էր այն մասին, որ ավելի

հավանական է, որ տաուրինը պաշտպանիչ ազդեցություն ունի արյան համակարգի և արյունատար անոթների վրա, քանի որ վիպերիդների թույները արտահայտված հեմոտրոպ ազդեցություն ունեն ի տարբերություն ասպիդների թույների, որոնք ունեն հիմնականում նեյրոտրոպ ազդեցություն:
Մենք փորձեցինք պարզել տաուրինի չափաքանակի այն տիրույթը, որը հակատոքսիկ ազդեցություն կունենար գյուրզայի թույնի դեմ: Այդ նպատակով կատարվեցին հետևյալ նախնական, կողմնորոշիչ փորձերը: Մեր փորձերում կենդանիները բաժանվել են 3 խմբի: Առաջին խումբը ստացել է 5մգ/կգ չափաբաժնով գյուրզայի թույն ներորովայնային ներարկման ուղիով, որը ՄՉ50 –ը գերազանցում է 2.5 անգամ: Երկրորդ խմբի կենդանիները ստացել են նույն չափաբաժնով թույն և 100մգ/կգ տաուրին ևս ներորովայնային ներարկմամբ անմիջապես թույնի ներարկումից հետո: Իսկ երրորդ խումբը ստացել է թույն 5մգ/կգ և տաուրին 500մգ/կգ: (նկար 4):
Ինչպես երևում է նկար 3-ում բերված տվյալներից կարելի է գալ նախնական եզրակացության՝ 100մգ/կգ տաուրինը ցուցաբերում է և հակաթունային ազդեցություն և պրակտիկորեն գործում է որպես անտիդոտ:



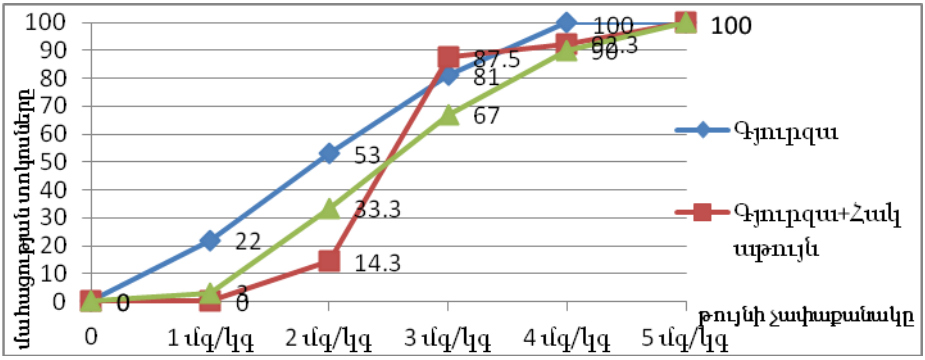
Նկար 3. Առնետների գոյատևումը տաուրինի տարբեր չափաբաինների դեպքում, նախնական փորձեր:

Տաուրինի կիրառման դեպքում շատ ցայտուն դրական ազդեցությունից ելնելով, մենք հետազոտությունները տեղափոխեցինք մկների մեծ գլխաքանակի վրա վիճակագրական տվյալների ճշգրտությունը ապահովելու համար: Ընդամենը եղել է կենդանիների 6 խումբ, որից մեկը ստուգիչ խումբն է: Բոլոր խմբերի կենդանիներին ներարկվել է 5մգ/կգ չափաբաժնով թույն և տաուրին 1մգ/կգ, 5մգ/կգ, 50մգ/կգ, 100մգ/կգ և 200մգ/կգ չափաբաժիններով համապատասխանաբար, բացի ստուգիչ խմբից: Ստուգիչ խմբի կենդանիների մահվան միջին ժամանակը եղել է 127.7 ± 17.8 րոպե, ինչը շատ մոտ է Գրիգորևի և համահեղ. ստացված տվյալներին (Grigorev G. et al.,1991), նկար 4:
Սկսած չորրորդ խմբից՝ 50 մգ/կգ տաուրին ստացած խմբից մահացությունը նվազում է և այդ խմբում կազմում է 83.3%, իսկ 100մգ/կգ և 200մգ/կգ տաուրին ստացած խմբերում մահացությունը 66.6% է, այսինքն գոյատևման հավանականությունը ավելանում է մինչև 33.3%:



Նկար 4. Մկների անհատական գոյատևման ժամանակի երկարացման դիագրամը տաուրինի տարբեր չափաքանակների կիրառման դեպքում

Վերը կատարված փորձի տվյալներից եզրահանգելով, որ 100մգ/կգ տաուրինի չափաբաժինը օպտիմալ է հակատոքսիկ ազդեցություն ցուցաբերելու համար, այս չափաբաժնով կատարվել է գյուրզայի թույնի տոքսիկության թուլացման որոշում Բերենսի մեթոդով: Համեմատության համար որոշվել է թույնի տվյալ կիթի նորմալ տոքսիկությունը և նրա տոքսիկության թուլացումը սպեցիֆիկ իմունոլոգիական բուժիչ «Անտիգյուրզին» շիճուկի կիրառմամբ:
Անտիգյուրզինի չափաքանակը համապատասխանում է մարդկանց համար կիրառվող չափաքանակին ըստ զանգվածի: Ամփոփիչ տվյալները ներկայացված են նկար 5-ում:

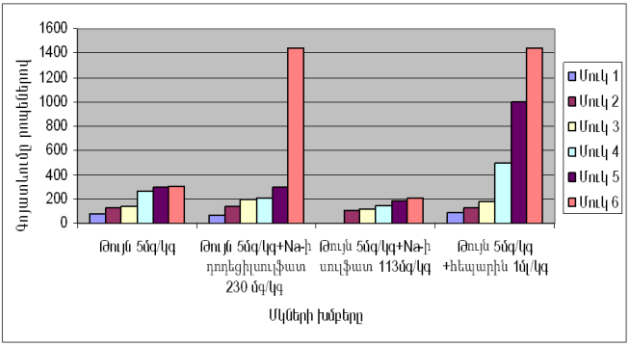


Նկար 5. Մկների մահացության հավանականությունը համեմատական հետազոտություններում

Մկների զանգվածին համապատասխանաբար 100մգ/կգ չափաբաժնով տաուրինի կիրառմամբ գյուրզայի թույնի ներորովայնային ներարկման համար մահացու չափաբաժինը կազմել է 2.75մգ/կգ: Սա նշանակում է որ թույնի ազդեցությունը մոտավորապես 30%-ով կամ 1.5 անգամ նվազել է:
Այս համեմատական հետազոտությունը երևան է բերում այն փաստը, որ չնայած թույնի ցածր չափաբաժիններ օգտագործելու ժամանակ «Անտիգյուրզին» սպեցիֆիկ շիճուկը ունի ավելի էֆեկտիվ ազդեցություն, տաուրինը ազդում է հավասարաչափ և ի տարբերություն շիճուկի թույնի բարձր չափաբաժինների ժամանակ դրսևորում է ավելի բարենպաստ ազդեցություն:

3.1.2. Սուլֆոխմբերի դերի ուսումնասիրումը, որպես տաուրինի հակատոքսիկ հատկության ակտիվ խմբի հնարավոր թեկնածու

Հայտնի է, որ շատ անտիդոտներ պարունակում են ծծումբ կամ սուլֆոխումբ:
Պետք էր պարզել արդյոք թույնի ազդեցության ժամանակ տաուրինի սուլֆոխումբը հակաթույնի ուղղակի դեր ունի թե ոչ: Այդ պարզելու համար կատարվել են հետևյալ փորձերը: Փորձերի համար ընտրվել են սուլֆոխումբ պարունակող միացություններ՝ նատրիումական աղեր առանց խարիսխային ամինոխմբի: Փորձերի մեջ օգտագործված թիոսուլֆատը, սուլֆատը, նատրիումի դոդեցիլ սուլֆատը և սուլֆացիլը կիրառվել են 100մգ/կգ տաուրինի կոնցենտրացիային էկվիմոլյար կոնցենտրացիաներով:
Ստացված արդյունքները բերված են համեմատական դիագրամում, նկար 6-ում:



Նկար 6. Մկների անհատական գոյատևման ժամանակի երկարացման դիագրամը տարբեր սուլֆոխումբ պարունակող միացությունների կիրառման դեպքում

Փորձարկված սուլֆատային խումբ պարունակող պատրաստուկներից ոչ մեկը չի ցուցաբերել արտահայտված հակատոքսիկ ազդեցություն գյուրզայի թույնի դեմ (թիոսուլֆատի և սուլֆացիլի տվյալները ընդգրկված չեն դիագրամի մեջ, քանի որ համընկնում են Na-ի սուլֆատի տվյալների հետ): Համեմատության համար բերված է հեպարինի ազդեցության դիագրամը:
Չնայած, որ կիրառած պատրաստուկների օգնությամբ գոյատևումը բարձրացել է 16 %-ով, տաուրինի դեպքում այն կազմում է 30%-ից ավելին, այդ պատճառով այս

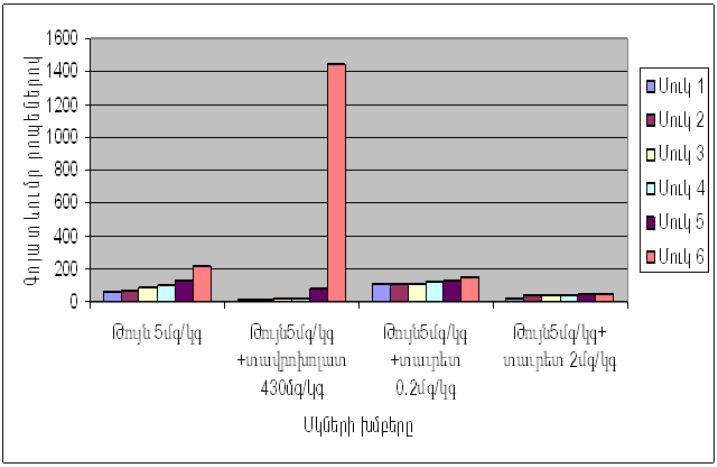
փորձերի արդյունքները հիմք չեն տալիս ենթադրելու որ տաուրինի հակատոքսիկ ազդեցությունը հիմնվում է միայն սուլֆոխմբի առկայության վրա:

3.1.3. Տաուրինի կոնյուգատների՝ տաուրետ, տավրոխոլատ և օձի լեղու ազդեցությունը

Հայտնի է որ տաուրինը մասնակցում է ճարպային փոխանակությանը, բարելավում է էներգետիկ փոխանակությունը, մտնում է լեղաթթուների կազմի մեջ կազմելով կոնյուգատներ (Donald A., 1978; Jacobsen J. et al., 1968):

Մենք ուզում էինք պարզել, թե առկա է արդյոք տաուրինի հակատոքսիկ ազդեցությունը կոնյուգացված վիճակում, ինչպիսին որ նա լինում է որոշ լիպոֆիլային միացությունների հետ կապի ժամանակ:

Ընդհանուր առմամբ փորձի մեջ ընդգրկվել են 4 խումբ որից մեկը ստուգիչ խումբն է: Բոլոր խմբերի կենդանիները ստացել են 5մգ/կգ չափաբաժնով թույն: Երկրորդ խումբը ի հավելում թույնին ստացել է նատրիումի տավրոխոլատ տաուրինի կոնցենտրացիային համապատասխան էկվիմոլյար քանակով, երրորդը խումբը՝ տաուրետ 0.2մգ/կգ, իսկ չորրորդը՝ տաուրետ 2մգ/կգ չափաբաժնով, նկար 7:

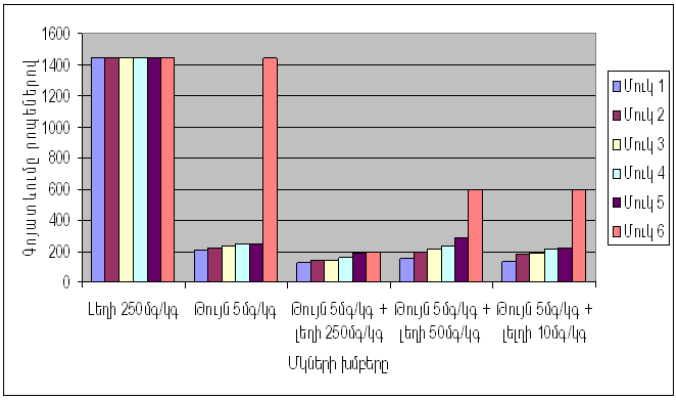


Նկար 7. Մկների անհատական գոյատևման ժամանակի երկարացման դիագրամը տաուրինի որոշ կոնյուգատների կիրառման դեպքում

Փորձերի արդյունքները ցույց տվեցին որ տաուրինի կոնյուգատները չեն ցուցաբերում այնպիսի հակատոքսիկ ազդեցություն ինչպիսին տաուրինը:

Ի հավելումն կոնյուգատների հետազոտման փորձերի, մենք օգտագործել ենք օձի լեղին, որը նույնպես հանդիսանում է տաուրինի և լեղաթթուների կոնյուգատների խառնուրդ: Ընդամենը եղել է կենդանիների 5 խումբ: Առաջին խմբի կենդանիներին ներորովայնային ուղիով ներարկվել է գյուրզայի լեղի 250մգ/կգ, մնացած խմբերի կենդանիներին ներարկվել է 5մգ/կգ չափաբաժնով թույն և երրորդ, չորրորդ և հինգերորդ խմբերի կենդանիներին ի հավելում թույնին ներարկվել է լեղի 10 մգ/կգ, 50 մգ/կգ և 250մգ/կգ համապատասխանաբար, նկար 8-ում:

Բենեֆիցիալ ազդեցություն չունի նաև օձի լեղին ներորովայնային ներարկմամբ:



Նկար 8. Մկների անհատական գոյատևման ժամանակի երկարացման դիագրամը գյուրզայի լեղու կիրառման դեպքում

Այսպիսով ստացված տվյալներից կարելի է գալ այն եզրակացության, որ տաուրինը շատ ավելի բարենպաստ հակատոքսիկ ազդեցություն է ցուցաբերում, քան իր կապված ձևերը՝ կոնյուգատները:

3.2. Կենդանական թույների անոթքայքայիչ ազդեցության համեմատական հետազոտությունը մազանոթային համակարգում, և տաուրինի պաշտպանիչ նշանակությունը գյուրզայի թույնի հեմոռագիկ ազդեցության դեմ

3.2.1. Առնետների ուղեղի մազանոթների վնասվածքների հետազոտություն

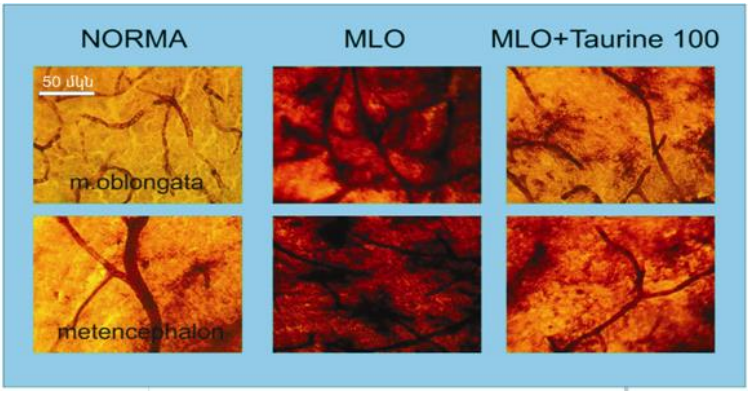
Արյունատար միկրոանոթները հանդիսանում են ԿՆՀ-ի միկրոմիավորի առուցվածքաֆունկցիոնալ բաղադրիչներից մեկը: Մեր ուսումնասիրության թիրախում է հայտնվել առնետի գլխուղեղի արյունատար անոթների վնասումը գյուրզայի թույնի հեմոռագիկ ազդեցության դեպքում, քանի որ էնդոթելիալ բջիջները և արտաբջջային մատրիքսը հանդիսանում են ՆԱՄ-ի ամենախոցելի տարրերից մեկը: Այդ վնասվածքների դեմ իբրև պաշտպանող նյութ հնարավոր համարեցինք օգտագործել տաուրինը, որի անոթպաշտպանիչ դերը արդեն հայտնի էր շաքարախտի բուժման ժամանակ:

Նախնական փուլում կատարվել են հիստոքիմիական հետազոտություններ, որոնց խնդիրն է եղել պարզել իժերի և ոչ իժերի կենդանական թույների անոթների վրա ցուցաբերվող քայքայիչ ազդեցությունը և վերը նշված հիստոքիմիական մեթոդի (Чилингарян А., 1986) ադեկվատությունը կատարվող աշխատանքի համար:

Կատարվել են հետևյալ թույների հիստոքիմիական հետազոտությունները՝ իժերից - գյուրզա (*Macrovipera lebetina obtusa*) և Ռասսել իժ (*Daboia russelli russelli*), ասպիդներից - կոբրա միջինասիական (*Naja naja oxiana*) ինչպես նաև մեղու մեղվաբեր (*Apis mellifera*):

Հետազոտությունները կատարվել են առնետների գլխուղեղի արյան միկրոշրջանառության համակարգի հետազոտման ուղղությամբ: Հաշվի առնելով, որ

գլխուղեղի արյունաուղեղային պատնեշը տարբեր բաժիններում ունի տարբեր թափանցելիություն ուստի մենք հետազոտել ենք ուղեղի տարբեր բաժինները:
Բոլոր թույները ներարկվել են 2.5 ՄՉ$_{50}$-ի հաշվարկով համապատասխան յուրաքանչյուր թույնի ՄՉ$_{50}$-ին (Орлов Б. и др., 1990; Восканян А.В. 1999; Kocholaty W., et al 1971): Ներարկումից 1 ժամ անց կենդանիները քնեցվել են 40 մգ/կգ նեմբուտալով, այնուհետև կատարվել է դեկապիտացիա: Գլխուղեղը գանգատուփից հեռացնելուց հետո այն մշակվել և հիստոքիմիական հետազոտության է ենթարկվել Չիլինգարյանի մեթոդով (Чилингарян А. и др., 1986):
Ստացված արդյունքներից պարզ է դառնում, որ ի տարբերություն կոբրայի, մեղվի և անգամ Ռասսելի իժի թույների, գյուրզայի թույնը խիստ տարբերվում է իր անոթքայքայիչ ազդեցությամբ ուղեղի տարբեր բաժիններում, իսկ օգտագործած հիստոքիմիական մեթոդը բավականաչափ ադեկվատ արտահայտում է այդ երևույթը: Քանի որ 100մգ/կգ տաուրինը ունի հակաթունային ազդեցություն գյուրզայի թույնի դեմ անհրաժեշտ էր պարզել արդյոք այդ հակատոքսիկ ազդեցությունը կատարվում է անոթները պաշտպանելու միջոցով թե այդ ազդեցությունը պայմանավորված է այլ մեխանիզմներով: Այդ պատճառով կատարվել է հետևյալ փորձերը: Փորձերը կատարվել են երկու խումբ կենդանիների վրա: Առաջին խմբի կենդանիներին ներորովայնային ուղիով ներարկվել է տաուրին 100մգ/կգ չափաբաժնով, իսկ երկրորդ խմբին 5մգ/կգ գյուրզայի թույն և 100մգ/կգ տաուրին:
Համեմատելով միայն գյուրզայի թույն ստացած խմբի կենդանիների միկրոնկարների հետ կարելի է նկատել, որ տաուրինի ներարկումը կանխում կամ թուլացնում է թույնի ազդեցությունը, նկար 9:



Նկար 9. Առնետի գլխուղեղի մազանոթային ցանցի համեմատական միկրոնկարներ նորմայում, գյուրզայի թույնի, գյուրզայի թույնի և տաուրինի համակցված ազդեցությունների դեպքում

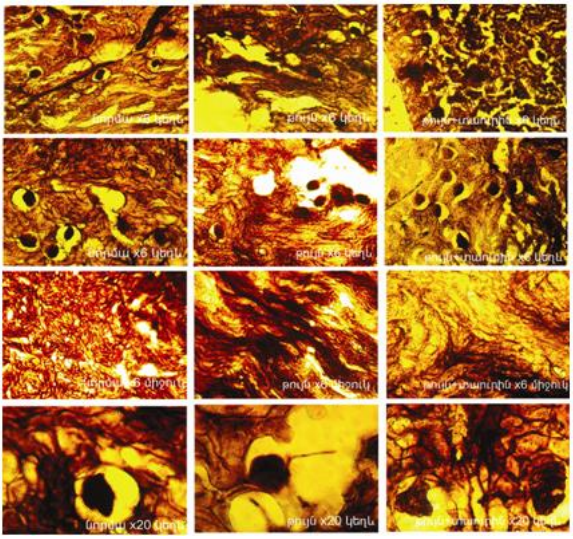
3.2.2. Առնետների երիկամների վնասվածքի հիստոքիմիական հետազոտություններ

Երիկամներում տաուրինը մասնակցում է մի շարք կենսաբանական գործընթացներին, իսկ երիկամները, իրենց հերթին, առանցքային դեր են խաղում

տաուրինի հոմեոստազի պահպանման գործում (Han X. et al., 2000; Han X. et al., 2006): Հայտնի է, որ տարբեր թունավորումների դեպքում երիկամները, այլ օրգանների հետ համեմատած, ավելի «տուժված» են լինում: Դա բացատրվում է նրանով, որ հենց երիկամներն են հանդիսանում արյունը վնասակար նյութերից մաքրող ինքնատիպ ֆիլտր: Բացառություն չէ նաև գյուրզայի թույնը, որի ազդեցության ժամանակ թունավորման ախտանիշների մեջ ընդգրկվում է նաև երիկամային անբավարարությունը (Орлов Б. и др., 1977):

Այդ պատճառով ստորև կատարված հետազոտությունների նպատակն է եղել պարզել, թե ինչ ազդեցություն է ունենում գյուրզայի թույնը առնետների երիկամների կառուցվածքի և մազանոթային ցանցի վրա: Ենթափորձային կենդանիները բաժանվել են չորս խմբի: Առաջին խումբը՝ ստուգիչ խումբն է: Մյուս խմբերին ներարկվել է ներորովայնային ուղիով, համապատասխան խմբերին՝ 5մգ/կգ թույն, 100մգ/կգ տաուրին, 5մգ/կգ թույն և 100մգ/կգ տաուրին համակցված: 2 ժամ անց կենդանիները քնեցվել են և երիկամները հեռացվել են: Երիկամները տեղադրվել են 5% ֆորմալինի մեջ, իսկ հետագա մշակումը և պատրաստուկների պատրաստումը կատարվել է ըստ Չիլինգարյանի մեթոդի (Чилингарян А. и др., 1986):

Նկար 10-ի վրա պատկերված միկրոնկարներից երևում է, որ տաուրինի կիրառումից հետո մանրադիտակի տեսադաշտում ավելի հաճախ են հանդիպում պահպանված Բոումենի պատիճներ քան թույնի ազդեցության ժամանակ, որը հնարավոր է կապված է տաուրինի ծայրահեղ արտահայտված ջրաղային և թթվային հավասարակշռության պահպանման հատկության հետ ինչն իր հերթին շատ կարևոր է երիկամների բուն գործունեության համար:



Նկար 10. Առնետների երիկամների միկրոնկարներ նորմայում, թույնի և թույն տաուրին համակցված ազդեցության ժամանակ:

3.3. Տաուրինի հակատոքսիկ և անոթպաշտպանիչ մեխանիզմների հետազոտությունը՝ թույնի թիրախային բաղադրիչները և մետաբոլիկ փոփոխությունները

3.3.1 Գյուրզայի թույնի դեմ տաուրինի ազդեցության հետազոտությունները *in vitro* պայմաններում

Վերը կատարված փորձերի արդյունքներից երևում է որ տաուրինը օրգանիզմում թուլացնում է գյուրզայի թույնի ազդեցությունը: Այդ փաստը բացահայտելուց հետո անհրաժեշտ էր պարզել արդյոք տաուրինը ունի անմիջական ազդեցություն գյուրզայի թույնի բաղադրիչների վրա: Այդ պատճառով կատարվեցին *in vitro* փորձեր:

Թույնի վրա տաուրինի արգելակող ներգործության մեխանիզմը in vitro եղանակով պարզելու համար մենք առաջին հերթին ուսումնասիրել ենք տաուրինի անմիջական փոխազդեցությունը թույնի որոշ ֆերմենտների ակտիվության վրա:

Քանի որ գյուրզայի թույնի հիմկական քայքայիչ ֆերմենտները հանդիսանում են Ֆոսֆոլիպազա A_2-ը և մետալոպրոտեինազա Pl-ը, ուստի մենք որոշեցինք *in vitro* ստուգել այդ երկու ֆերմենտների ակտիվությունը տաուրինի առկայությամբ:

Մենք ընտրել ենք երկու էքսպրես - թեստ, որոնց միջոցով կարելի է գնահատել թույնի էնզիմատիկ ակտիվությունը:

1. Ֆոսֆոլիպազա A_2 ի ակտիվության որոշման մեթոդը ձվի դեղնուցի լուծույթի մակարդման միջոցով (Солодухо И. и др. 1967, մոդիֆիկացված մեր լաբորատորիայում՝ Восканян А., 1994):
2. Կաթի մակարդման միջոցով թույների կոագուլազային ակտիվության որոշման պարզ և արդյունավետ թեստ (գյուրզայի թույնի իսկության թեստ), որը մշակվել է մեր կողմից (Восканян А. и др., 2003):

Սակայն այս մեթոդը պիտանի է միայն գյուրզայի թույնի նույնականացման համար, քանի որ օրինակ ռասսել իժի և ռադեի թույնը չի մակարդում կաթը 1:5000 կոնցենտրացիայով:

Բացահայտելու համար թե թույնի որ բաղադրիչն է դրսևորում կազեինոլիտիկ հատկություն կատարվել են հետևյալ կաթի մակարդելիության թեստի մեջ ապրոտինինի, որպես սերինային պրոտեազների ինհիբիտոր, $BaCl_2$, $NiCl_2$, $CuCl_2$-ի, որպես մետալոպրոտեինազի (ՄՊ) ցինկի հետ մրցակից երկվալենտ կատիոնների փոխազդեցությունը թույնի հետ: Գյուրզայի թույնի և կաթի հարաբերությունը 1:5000

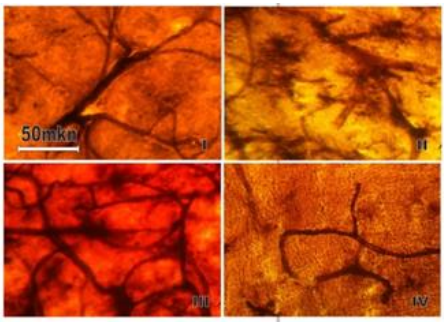
Տաուրինի և կաթի հարաբերությունը 1:10000 էր (համապատասխանում է 100մգ/կգ չափաբաժնին): $BaCl_2$-ի չափաքանակը՝ 10.4մգ, $NiCl_2$՝ 6.5մգ, $CuCl_2$՝6.7մգ, այսինքն 5մլ կաթում՝ 10մՄոլ համապատասխան նյութ: Ապրոտինինի չափաքանակը 0.1մգ (1մգ ապրոտինինը համապատասխանում է 1ATpE՝ հակատրիպսինային միավոր:

Այն փաստը որ կաթի մակարդումը գյուրզայի թույնի ազդեցության ժամանակ չի բեկանվում ապրոտինինի կողմից, հավաստիացնում է, որ կաթի մակարդումը կապված չէ սերինային պրոտեազների ակտիվության հետ այլ ըստ երևույթին կապված է ՄՊ-ի հետ: Սակայն մրցակից երկվալենտ կատիոնները նույնպես չեն բերում գյուրզայի թույնի ՄՊ -ի ակտիվության պակասեցմանը: որից կարելի է եզրակացնել, որ այս հետազոտվող ֆերմենտի ցինկը բավական ամուր է խարիսխված իր ակտիվ կենտրոնին և պաշտպանված է շրջակա ազատ երկվալենտ իոնների ազդեցությունից:

Այնուամենայնիվ թույնը 15 րոպե ջրային բաղնիքում՝ 70˚C ջերմաստիճանում ինկուբնելուց հետո,այն կորցրել է իր մակարդելու հատկությունը, որը հանդիսանում է ապացույց կաթի մակարդող էնզիմի ջերմաանկայուն լինելու վերաբերյալ իսկ ինչպես հայտնի է գյուրզայի թույնի ամենաջերմաանկայուն ֆերմենտները՝ ՄՊ-ներն են:

3.3.2. Գյուրզայի թույնի ֆրակցիաների հեմոռագիկ ազդեցության համեմատական հետազոտություն

Որպիսի բացահայտենք թե որ ՄՊ-ի ազդեցության հետ է կապված անոթների հեմոռագիկ քայքայումը կիրառվել է գյուրզայի թույնից FPLC-ի եղանակով անջատված 4 ֆրակցիաներ (Babayan B. et al., 2010) հիստոքիմիական հետազոտություններ կատարելու համար: ֆրակցիա I-ը պարունակում է 0-20կԴա քաշ ունեցող պեպտիդներ և սպիտակուցներ, ֆրակցիա II-ը՝ 20-30 կԴա, Ֆրակցիա III՝ 30-60 կԴա իսկ ֆրակցիա IV-ը 60 և ավելի կշիռ ունեցող սպիտակուցներ և պոլիպեպտիդներ: Ֆրակցիաներն օգտագործվել ենք համապատասխան գյուրզայի թույնի 2.5 LD50-ի 30 % չափաբաժնով, հաշվի առնելով ամբողջական թույնի մեջ ՄՊ PI-ի տոկոսային պարունակությունը: Հիստոքիմիական հետազոտությունների արդյունքում ստացված միկրոնկարները բերված են նկար 11-ում:

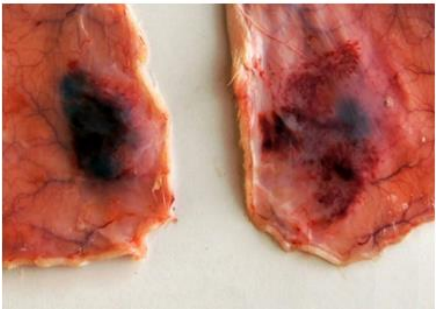


Նկար 11. Ֆրակցիա ներարկած առնետների գլխուղեղի միկրոնկար՝ խոշորացումը x40 I, II, III, IV թվերը համապատասխանում են օգտագործած թույնի ֆրակցիաների համարներին

Ինչպես երևում է նկարից I և IV ֆրակցիաները գրեթե ոչ մի ազդեցություն չեն թողել անոթքայքաման տեսակետից և այդ խնբի միկրոնկարները շատ մոտ են ինտակտ առնետի ուղեղի մազանոթային ցանցի նկարներին: Իսկ II և III ֆրակցիաները ունեցել են անոթքայքայիչ ազդեցություն, սակայն ի տարբերություն III ֆրակցիայի, II ֆրակցիայի քայքայիչ ազդեցությունը ավելի ուժեղ է արտահայտված որից մենք կարող ենք եզրակավնել որ գյուրզայի թույնի հեմոռագիկ ազդեցություն առաջացնող հիմնական էնզիմը 23 կԴա քաշ ունեցող PI ՄՊ- ն է (լեբետազա 2): Սակայն հարավոր է որ PIII ՄՊ- ն նույնպես ունի հեմոռագիկ ակտիվություն:

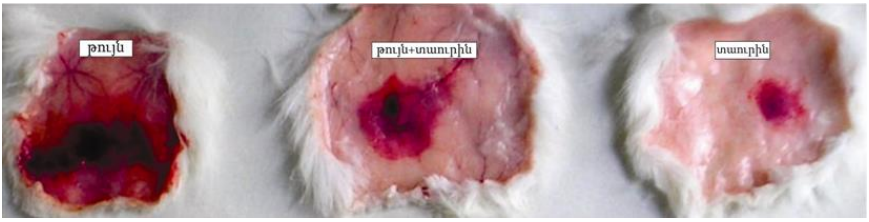
3.3.3. ՄՊ PI –ը իբրև գյուրզայի թույնի հիմնական հեմոռագիկ գործոն:

Տաուրինի հակամակարդիչ դերը պերիֆերիկ անոթներում: Պպարզելու համար տաուրինի ազդեցությունը թույնի մակարդիչ գործունեության դեմ կատարվել են մակրոհիստոլոգիական փորձեր առնետների մաշկի վրա թույնի, տաուրինի, թույնի և տաուրինի համակցված ազդեցության ժամանակ:



Նկար 12. Ձախ կողից ենթամաշկային ուղիով թույն ներարկված կենդանու մաշկ; աջ կողմից թույն՝ենթամաշկային, և տաուրին՝ ներորովայնային ուղիով

Ինչպես երևում է նկար 12-ից միայն թույն ներարկված խմբի կենդանիներից հեռացված մաշկի ներսի կողմից նկատվել է արյան մակարդուկներով հագեցած հեմոռագիկ համախմբված օջախ: Իսկ թույն+տաուրին ներարկված կենդանու մաշկի վրա կենտրոնական օժախը ավելի փոքր է, մակարդուկները ավելի քիչ են և հիմնականում ցրված են կենտրոնական օջախի շուրջ:
Հաշվի առնելով այն հանգամանքը, որ տաուրինը ինքնին հանդիսանում է հակամակարդիչ միջոց կատարվեցին համեմատական հետազոտություններ հասկանալու համար, թե արդյոք ինքը տաուրինը կարող է առաջացնել արյան զեղումներ, որոնք բնորոշ են մեծ քանակությամբ հակամակարդիչ նյութերին:
Ինչպես երևում է նկար 13-ից տաուրինի ներարկումը բերում է թույլ արտահայտված արյան զեղմանը: Տվյալ հետազոտությունը թույլ է տալիս բացահայտելու տաուրինի բարենպաստ ազդեցությունը գյուրզայի թույնի դեմ արյան մակարդման թուլացման մեխանիզմի միջոցով: Այսպիսով տաուրինի հակատոքսիկ մեխանիզմներից կարող է հանդիսանալ տաուրինի հակակոագուլյացիոն հատկությունը գյուրզայի թույնի ազդեցության ժամանակ:
Մակրոհիստոլոգիական հետազոտության է ենթարկվել նաև ֆրակցիա II-ի ազդեցությունը պերիֆերիկ անոթների վրա, այն ներարկվել է թույնի 30%-ի չափով: Արդյունքում ֆրակցիա II –ը գործնականորեն ցուցաբերել է գրեթե նույն ազդեցությունը ինչ որ թույնը:



Նկար 13. Ձախից՝ գյուրզայի թույն ներարկված մաշկի կտոր, մեջտեղում թույն և տաուրին, աջից՝ միայն տաուրին, ենթամաշկային ներարկումներ

ՎԵՐՋԱԲԱՆ

Հիմնվելով ստացված փորձարարական տվյալների վրա և վերահիմաստավորելով գրականության մեջ բերված փաստերը, կարելի է մոտավորապես վերականգնել կատարվող գործընթացների պատկերը:

Գյուրզայի մետցինկիները P-I և P-III-ը դրսևորում են տարբեր արտահայտվածության հեմոռագիկ ազդեցություն: Սակայն եթե ուրիշ իժազգիների թույներում ավելի ակտիվ է P-III մետցինկինը, գյուրզայի մոտ ավելի ակտիվ է P-I մետցինկինը, որը համաձայն տվյալ օձի լատինական անվանմանը կոչվում է լեբետազա (Siigur J. et al., 1998):

Տաուրինի ազդեցության մեր կողմից առաջարկված հիպոտետիկ մեխանիզմը հանդիսանում է հետևյալը: Թույնի էնզիմների զանգվածային գրոհը ընդանում է մի քանի ուղղությամբ՝ L α ամինոօքսիդազան վերածելով ամինոթթուները օքսիամինոթթուների, բերում է լեյկոցիտների որոշ դասի, նեյտրոֆիլների համար, ազդանշային մոլեկուլ հանդիսացող ջրածնի պերօքսիդի սինթեզին: Վերջինս հանդիսանում է ազդանշանային ոչ միայն նեյտրոֆիլների դրական տաքսիսի համար, որոնք մոտենում են այդ տիրույթին, այլ նաև հանդես է գալիս իբրև ազդանշան էնդոթելի բջիջների դեզինտեգրացիայի, այսինքն իրարից հեռացման համար: Այդ ժամանակ միջբջջային ճեղքերով սողոսկում են մետցինկիների մոլեկուլները: Ֆիքսված էնզիմները սկսում են քայքայել կոլագենային մատրիքսը որը, և հանգեցնում է անոթի ամբողջականության քայքայմաը: Վրա հասած նեյտրոֆիլները սկսում են արտադրել մեծ քանակությամբ H_2O_2 և HOCl (հիպոքլորային թթու), որոնք նախատեսված են «թշնամու» քսենոբիոտիկներին չեզոքացնելու համար: HOCl-ի զանգվածային արտադրությունը հրահրում է մի շարք ուրիշ մետաբոլիկ գործընթացների առաջացումը, որն ընդհանուր առմամբ բերում է խիստ արտահայտված բորբոքային երևույթների: Ի հավելումն այս բորբոքմանը զարգանում են այլ բորբոքային պրոցեսներ կապված ֆոսֆոլիպազա A_2 էնզիմի և բրադիկինին խթանող պեպտիդի գործունեության հետ: Օձի թույնի ֆոսֆոլիպազա A_2 –ը առաջացնելով առախիդոնային թթվի և լիզոլեցիտինի մեծ քանակներ, ավելացնում է բորբոքային հատկություն ունեցող պրոստագլանդինների քանակը: Այս համատարած բորբոքային գործընթացների ժամանակ տաուրինը հանդես է գալիս իբրև ծայրահեղ արտահայտված հակաբորբոքային և պաշտպանիչ միջոց: Այն արագ կապվում է արտազատվող ազատ քլորի հետ վերածվելով քլորոտաուրինի (Kim C. et al., 2014): Վերջինս ոչ միայն տոքսիկ չէ և խիստ մեղմացնում է ազատ քլորի տոքսիկ ազդեցությունը, այլ նաև հանդիսանում է մետցինկիների ցածրմոլեկուլյար ակտիվ ինհիբիտոր, իսկ մյուս կողմից խթանում է մետցինկիների ինհիբիտորների ակտիվությունը: Այսպիսով տաուրինը հանդիսանալով վերին աստիճանի ցածր տոքսիկություն ունեցող, օրգանիզմի համար ծայրահեղ անհրաժեշտ նյութ, անմիջականորեն մասնակցում է մետալոպրոտեինազների կոլագեն ռեմոդելավորող գործընթացների մեջ: Պետք է նաև հաշվի առնել այն բանը, որ իբրև կանոն P-I մետալոպրոտեինազները նաև խափանում են միջբջջային ադհեզիան և անգիոգենեզը (Kim C. et al., 2014): Սակայն երբ գործ ունենք ոչ թե բնականոն գործընթացների հետ այլ օձի թույնի մեծաքաքնակ էնզիմների օրգանիզմ ներթափանցման հետ, էնդոգեն տաուրինի քանակները չեն բավարարում պաշտպանության համար: Մեր փորձերից

ստացված հենց 100մգ/կգ զանգվածին էկզոգեն տաուրինի քանակը հանդիսանում է տաուրինի այն չափաբաժինը, որի միջոցով կարելի է ծավալել օպտիմալ պայքար գյուրզայի թույնի դեմ: Այս հիպոթեզը միտված է բացատրելու տաուրինի անոթպաշտպանիչ հատկությունները, սակայն տաուրինի բենեֆիցեալ ազդեցությունը տարածվում է նաև արյան մակարդման համակարգի վրա, թուլացնելով մակարդման գործընթացը տաուրինը մեղմացնում է թույնի կողմից հրահրված իշեմիկ գործընթացները: Այսպիսով էկզոգեն տաուրինի ընդունումը օձի խայթոցի ժամանակ, ոչ միայն պաշտպանում է անոթների կոլագենը քայքայումից այլ նաև հեշտացնում է վերականգնողական գործընթացները վնասված տիրույթում: Հիմնվելով գիտական հետազոտությունների տվյալների վրա կարելի է այս ամենին ավելացնել տաուրինի օսմոռեգուլյատոր հատկությունները, որոնք թույլ են տալիս արագ վերականգնել աղա-ջրային և թթվային հավասարակշռությունը: Տաուրինը հանդիսանալով «աղբ մաքրիչ» (scavenger) միանում է ֆոսֆոլիպազա A_2 –ի կողմից բջիջների քայքայված մեմբրանների ճարպային մնացորդներին, կազմում է կոնյուգատ և վերածում է նրանց ջրալուծ միացությունների, հեռացնելով վնասված տիրույթից (Li G. et al., 2010):

Այսպիսով տաուրինի վերոհիշյալ հատկությունները թույլ են տալիս մեզ դիտել տաուրինը իբրև շատ կարևոր, ոչ սպեցիֆիկ միջոց գյուրզայի խայթոցի դեմ:

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Տաուրինը ցուցաբերում է հակատոքսիկ էֆեկտ հեմոտրոպ բնույթ ունեցող գյուրզայի թույնի դեմ100մգ/կգ չափաբաժնով, որի արդյունքում մկների մահացությունը, ՄՉ50-ը իջնում է 30 % -ով, կազմելով 2.4 մգ/կգ՝ 1.8 մգ/կգ դիմաց:
2. Նեյրոտրոպ բնույթ ունեցող կբրայի թույնի դեմ տաուրինի հակատոքսիկ ազդեցության բացակայությունը վկայում է այն մասին, որ տաուրինի պաշտպանական մեխանիզմը կապված է արյունատար համակարգի պահպահման հետ:
3. Տաուրինի հակատոքսիկ ազդեցությունը հիմնված չէ զուտ սուլֆոխմբի առկայության վրա, քանի որ նմանատիպ սուլֆոխումբ պարունակող այլ միացությունները հակատոքսիկ ազդեցություն չունեն:
4. Տաուրինը գյուրզայի թույնի դեմ հակատոքսիկ ազդեցություն է ցուցաբերում որպես ազատ ամինաթթու, քանի որ կոնյուգացված վիճակում այն ոչ միայն չի գործում թույնի դեմ, այլ որոշ դեպքերում նույնիսկ խթանում է թույնի ազդեցությունը:
5. Տաուրինի ազդեցությունը գյուրզայի թույնի դեմ կապված է ոչ թե անմիջականորեն թույնի բաղադրիչների վնասազերծելու, այլ օրգանիզմում տեղի ունեցող վնասվածքները մեղմացնելու հետ:
6. Տաուրինը կատարում է անոթպաշտպանիչ դեր գյուրզայի PI մետալոպրոտեինազայի արտաբջջային մատրիքսի քայքայող ազդեցության դեմ:
7. Տաուրինը մասամբ մեղմացնում է գյուրզայի թույնը քայքայիչ ազդեցությունը, որի հետևանքով վնասվում է նեֆրոնների Բոումենի խոռոչի կառուցվածքային ամբողջականությունը:

8. Տաուրինը դրսևորում է հակամակարդիչ հատկություն և մասամբ թուլացնում է գյուրզայի թույնի ազդեցության հետևանքով առաջացած ՆՀՄ ախտանիշի զարգացումը:

ԱՏԵՆԱԽՈՍՈՒԹՅԱՆ ԹԵՄԱՅՈՎ ՀՐԱՏԱՐԱԿՎԱԾ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐԻ ՑՈՒՑԱԿ

1. Darbinyan A.A., Voskanyan A.V., Antonyan M.V., Gevorgyan S.S. Effect of heparin and taurine on viper venom toxicity. // The Young Sci. conf. “Perspectives devel. of Molecular and Cellular Biology”, Yerevan, May 5-6, 2008, p.63.
2. Восканян А.В., Антонян М.В., Геворгян С.С., Дарбинян А.А., Мелконян Н.Н., Петросян А.М. Ангиопротекторный эффект таурина против яда кавказской гюрзы. // Вестник МАНЭБ,Т.14, №4, Вып1., 2009, с.150-155.
3. Voskanyan A.V., Antonyan M.V., Gevorgyan S.S., Darbinyan A.A., Melkonyan NN. Taurine versus Levantine viper venom. // Intl. conference of Biotechnology and Health-3 & DAAD Alumni seminar, Yerevan, Octob.15-17, 2009, p.68-76.
4. Восканян А.В., Антонян М.В., Геворкян С.С., Дарбинян А.А., Мелконян Н.Н. Ослабление нейротоксичности яда гюрзы таурином. // В сб. “Актуалные. проб. интегр. деят. и пласт. нерв. системы.” “Междун. Конф. посвящ. 80-летию акад. В.В.Фанарджяна”. Ереван, 10-13 октября, 2012, с.93-97.
5. Восканян А.В., Антонян М.В., Дарбинян А.А., Геворгян С.С. Действие таурина против геморрагии, вызванной металлопротеиназой яда гюрзы (*Macrovipera lebetina obtusa*). // Биолог.журн.Армении, 1 (64), 2012, с.37-41.
6. Восканян А.В., Вардапетян Г.Р., Антонян М.В., Дарбинян А.А., Геворгян С.С. Антитоксический эффект кверцетина против действия яда гюрзы кавказской (*Macrovipera lebetina obtusa*). // Международная юбилейная конференция посвященная 130-летию со дня рождения академика Л.А. Орбели. В сб. «Физиол. механ. регуляции деятельности организма». Ереван, 22-24 сентября, 2012, с.112-116.
7. Оганесян М.Г., Дарбинян А.А. Антиноцицептивный эффект сульфоаминокислоты таурина при действии яда кавказской гюрзы (*Macrovipera lebetina obtusa*). // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2013». Москва, 8-13 апреля, 2013, с.341.
8. A.V. Voskanyan, V.V. Bezuglov, M.V.Antonyan, S.S. Gevorgyan, A.A. Darbinyan, M.G. Hovhannisyan, A.R. Koshatashyan. 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. Yerevan, September 22-24, 2013, p.36-37.
9. M. Hovhannisyan, A. Voskanyan, A. Darbinyan, M. Antonyan. Investigation of antinociceptive effects of taurine and some phytopreparations during *Macrovipera lebetina obtusa* venom action. // 8th Congress of the European Pain Federation EFIC. Florence, Italy, 9-12 October, 2013, p.414.
10. А.А.Дарбинян, Геморрагическое действие яда гюрзы Macrovipera lebetina obtusa в различных отделах головного мозга крыс. // Вопросы теоретической и клинической медицины. 2013., №6 (82), с.71-73.
11. А.А.Дарбинян, М.В.Антонян, А.В.Восканян, А.Р.Кошаташян, Г.Р.Вардапетян Сравнительный анализ действия различных животных ядов на микроциркуляторное русло мозга крыс. // Вопросы теоретической и клинической медицины. 2013., №6 (82), с.77-78.

ДАРБИНЯН АННА АШОТОВНА

“МЕХАНИЗМЫ АНТИТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ТАУРИНА ПРОТИВ ЯДА ГЮРЗЫ”

РЕЗЮМЕ

Укусы ядовитых змей часто чреваты тяжелыми последствиями, вплоть до смертельного исхода. От укусов змей страдают не только жители тропических районов, но и развитых стран. В Закавказье, из змей-ядоносов наиболее часто встречаются гадюковые, а самой опасной из них является Левантийская гадюка или гюрза (*Macrovipera lebetina obtusa*). Подвиды Левантийской гадюки, обитающие на территории Северной Африки, (*M.l.transmediterranea*.), в Средней Азии (*M.l. turanica*) и т.п., также являются очень опасными и при этом имеют яды различного состава, что требует особого изучения их компонентов и действия ядов каждого подвида. При тяжелых случаях укусов гюрзы может возникнуть шоковое состояние из-за развития сердечной недостаточности, патологических процессов в печени и почках, тромбозов и ишемии тканей из-за развития ДВС-синдрома и геморрагических повреждений в месте укуса и по всему организму, включая ЦНС. Применение специфических лечебных иммунологических сывороток часто затруднено из-за повышенной требовательности к условиям хранения, высокой стоимости и необходимостью введения со стороны квалифицированного персонала, а также развития аллегических реакций (e.g.-“Антигюрзин”). Однако многие препараты неспецифического действия также имеют побочные эффекты, так например, гепарин на фоне действия геморрагических ядов приводит к сильнейшим кровоизлияниям, а ударные дозы гормональных препаратов смещают метаболические акценты. Поэтому закономерно, что в последние годы внимание многих исследователей привлекла небелковая сульфоаминокислота таурин, как физиологически активное вещество с сильно выраженным антитоксическим действием. На сегодня хорошо известна мультифункциональная роль таурина в организме, начиная от регуляции осмотического давления в поврежденных тканях и клетках, образования конъюгатов со многими ксенобиотиками и до регуляции кальциевого аптейка в митохондриях. В настоящей работе исследовано антитоксическое действие таурина против яда гюрзы кавказской и изучены механизмы, лежащие в основе антидот-эффекта таурина по смягчению поражающего действия компонентов яда. В работе изучены эффекты экзогенного таурина при токсическом действии внутрибрюшинно введенного яда гюрзы, определен диапазон (50-200мг/кг массы мышей при в/б введении яда в дозе 2,5 $ЛД_{50}$) и оптимальная доза таурина для получения антитоксического действия (100мг/кг). Показана высокая эффективность таурина (33,4% ослабление $ЛД_{50}$) против яда гюрзы (гемотропного типа) по сравнению с ядом кобры среднеазиатской (нейротропного типа). Скрининг ряда физиологически и фармакологически активных препаратов по изучению возможной антитоксической активности сульфогруппы таурина, где определена антитоксическая активность

тауринового конъюгата цис-транс-ретиналя, таврохолата, додецилсульфата, сулфацила, сульфата натрия и и желчи гюрзы показал уникальность тауриновой системы сульфо- и аминогруппы для проявления свойств антидота. Учитывая то обстоятельство, что яд гюрзы обладает ярко выраженными геморрагическими свойствами, проведено исследование повреждений микроциркуляторного русла мозга крыс. Сравнительное гистохимическое исследование со специфическим окрашиванием капилляров головного мозга крыс при действии ряда ядов (гюрза, гадюка Рассела, кобра среднеазиатская, пчела медоносная) показало что повреждения, которые связаны непосредственно с геморрагическими влияниями сильнее всего выражены при действии яда гюрзы, и что повреждения микроциркуляторного русла ствола мозга массивнее, чем повреждения капилляров корковых структур мозжечка, гиппокампа и коры головного мозга. Полученные данные с использованием таурина показали, что таурин обладает хорошо выраженными ангиопротекторными свойствами и ослабляет сосудоразрушающее действие яда. Гистохимическое исследование повреждений нефронов в почках при действии яда гюрзы выявило повреждения капсулы Боумена при относительно интактном мальпигиевом клубочке и уменьшение количества повреждений при медикации таурина. Макроскопическими исследованиями по образованию очагов гематом и геморрагического повреждения ткани при внутрикожном введении яда и яда с таурином получено свидетельство о том, что таурин выказывает, наряду с ангиопротекторными свойствами, также и антикоагуляционный эффект, что очень важно для последующего реабилитационного этапа после поражения ядом. Суммарное увеличение поверхности и объема гематом несомненно облегчает их рассасывание и ускоряет восстановление ткани. Исследованием действия отдельных фракций яда и серией экспериментов *in vitro* установлено, что механизм антитоксического действия таурина направлен против разрушающего действия его главной мишени - геморрагического компонента яда гюрзы – металлопротеиназы P1, и в заключении работы приведена схема возможных механизмов антитоксического действия таурина, и обсуждается факт, почему те большие дозы таурина, которые в норме проявляют положительный эффект для многих функций организма, при действии яда являются фактором, усугубляющим его токсичность. Механизм действия таурина может быть реализован через ингибирование активности Zn-содержащей Ca-зависимой эндопептидазы (металлопротеаза P1). Допускается перспектива использования таурина в качестве доврачебного средства при укусах гюрзы, поскольку таурин абсолютно не имеет аллергического действия и является весьма доступным препаратом. Таурин зарегистрирован как лекарственное средство и может быть использован в режиме “новая область применения известного препарата”.

DARBINYAN ANNA

"MECHANISMS OF TAURINE ANTITOXIC ACTION AGAINST LEVANTINE VIPER VENOM"

SUMMARY

The bite of venomous snakes often had serious consequences, up to the death. Snake bites are dangerous not only for natives of the tropical countries, but also for developed countries. In the Transcaucasus most common venomous snakes are viperidaes, and the most dangerous of these is the Levantine Viper (*Macrovipera lebetina obtusa*). Levantine Viper subspecies found in North Africa, (*M. l. transmediterranea*), Central Asia (*M.l. turanica*) etc., are also very dangerous and their venoms have different composition that requires special consideration of their components of each subspecies. In severe cases, there may be a viper bites shock due to the development of heart failure, pathological processes in the liver and kidneys, thrombosis and cerebral tissues due to the development of disseminated intravascular blood coagulation syndrome and hemorrhagic lesions in the region of the bite and throughout the body, including the central nervous system. Application of specific serum immunological treatment is often difficult due to special conditions of storage and treatment, expensive cost and allergy reaction (e.g."Antigyurzin"). However, many drugs of nonspecific action also have side effects, for example, heparin treated versus the hemorrhagic venoms leads to the strongest bleeding, shock doses of hormonal drugs have shifted the metabolic accents. So it is reasonable that, in recent years, the attention of many researchers has attracted by free nonprotein sulfonic amino acid taurine as physiologically active substance with highly expressed antitoxic effect. It is well known multifunctional role of taurine in the body, ranging from regulation of osmotic pressure in the damaged tissues and cells, formation of conjugates with many xenobiotics and up to regulation of calcium uptake in mitochondria. In the present work it was investigated antitoxic effect of taurine against Caucasian Levantine viper venom and studied the mechanisms underlying the antidote-effect of taurine of reducing the lethality of venom components. In the studied effects of exogenic taurine on toxic action of intraperitoneally injected viper venom, it was defined range (i/p injection of taurine 50-200 mg/kg in mice and venom in dose of 2.5 LD_{50}) and the optimal dose of taurine to gain maximal antitoxic actions (100 mg/kg). The high effectiveness of taurine (33.4% weakening of the LD_{50}) against viper venom (haemothrope type) in spite of the Central Asian Cobra venom (neurothrope type) was established. Screening of a cluster of physiologically and pharmacologically active drugs to explore the possible antitoxic activity of taurine, related to sulphonic group was carried out, where was determined antitoxic activity of taurine conjugates with cis-trans-retinal, taurocholate, dodecilsulfate, sulfacilum, sodium sulphate and viper bile and was shown the uniqueness of taurine with its structure containing sulphonic and NH_2 groups to have antidot properties. Taking into account the fact that viper venom has pronounced haemorrhagic properties, the research of damages of rat brain microcirculatory bed was carried out. Comparative histochemical study with specific staining of

brain capillaries of rats under the action of different venoms (Viper, Cobra, Russell's viper, honey) showed that the injuries that are associated directly with haemorrhagic effects were most pronounced in case of viper venom action and the damages in brain stem microcirculatory bed were more massive than capillary damages of cortical structures of cerebellum, hippocampus and neocortex. The data obtained with treatment of taurine has shown that taurine has a pronounced angioprotective properties and weakens the vessel damaging effect of the Levantine viper venom. Histochemical study of kidney nephrons damages under the action of viper venom revealed injured Bowman's capsules with relatively intact Malpighian corpuscles and reduction of damaged capsules in case of taurine treatment. Research of hemorrhage and hemorrhagic damaged tissue when taurine was injected with venom have shown taurine additional properties as anticlotting agent, which is very important for later rehabilitation phase after the envenomation stage. The total increase in surface area and volume of hematoma undoubtedly facilitates the absorption and accelerates the regeneration of tissue. A study of the individual fractions of venom and a series of *in vitro* experiments determined that the mechanism of antitoxic effect of taurine against destructive hemorrhagic component targets the main enzymes of venom - metzinkins, i.e. Metalloproteinase P1, and the conclusion of the work is a diagram of the possible mechanisms of antitoxic effect of taurine and discusses why those large doses of taurine, which normally have a positive effect for many body functions, under the action of the venom became a factor, aggravating its toxicity. The mechanism of action of taurine can be implemented through inhibition of the activity of Zn-containing Ca-dependent endopeptidases (metalloprotease P1). There is a perspective to use taurine as a pre-medical remedy versus viper bites because taurine has absolutely no allergic effect and is very affordable product. Taurine is registered as a medicine and can be used in new applications of well-known remedy.