

კავკასიური შმაგას ალკალოიდების ციტოტოქსიკური აქტივობის შესწავლა

¹ლალი კინწურაშვილი, ²ჟან ლეგო, ^{1,2}ვახტანგ მშვილდაძე

¹ფარმაციის დოქტორი, თსუ იოველ ქუთათელაძის ფარმაცოქიმიის ინსტიტუტის უფროსი მეცნიერ თანამშრომელი, საქართველო, თბილისი, E-mail: l.kintsurashvili@tsmu.edu

²ბიოლოგიურ მეცნ. დოქტორი, კვებეკის უნივერსიტეტის ფუნდამენტურ მეცნიერებათა დეპარტამენტის პროფესორი, შიკაგო, კანადა.

^{1,2}ფარმაციის დოქტორი, თსუ იოველ ქუთათელაძის ფარმაცოქიმიის ინსტიტუტის უფროსი მეცნიერ თანამშრომელი, საქართველო, თბილისი. კვებეკის უნივერსიტეტის ფუნდამენტურ მეცნიერებათა დეპარტამენტის პროფესორი, შიკაგო, კანადა

აბსტრაქტი

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა საქართველოში მოზარდი *Atropa caucasica* Kreyer. კავკასიური შმაგას (ოჯ. Solanaceae-ძალყურძენასებრნი) მიწისზედა (მ/ზ) და მიწისქვეშა (მ/ქ) ორგანოების შესწავლა ტროპანის ჯგუფის ალკალოიდებზე და მათი ბიოლოგიური აქტივობის დადგენა. კავკასიური შმაგას ჰაერმშრალი დაწვრილმანებული მ/ზ და მ/ქ ორგანოებიდან სითხე-სითხოვანი ექსტრაგირებით მიღებულია ალკალოიდშემცველი ჯამური სუბსტანციები. 12% NH₄OH წინასწარი შეტუტიანებით და დაყოვნებით, ალკალოიდებს ვწვლილავდით ქლოროფორმით. ფუძეების ჯამური სუბსტანციების გამოსავალი შეადგენდა: მიწისზედა ორგანოებიდან- 0,28%, მიწისქვეშა ორგანოებიდან- 0,54% მცენარის ჰაერმშრალ მასალაზე გადაანგარიშებით. ფიტოქიმიური კვლევების შედეგად დადგენილია, რომ კავკასიური შმაგადან მიღებულ გასუფთავებულ ალკალოიდების ჯამურ სუბსტანციებში დომინირებენ ტროპანის ჯგუფის ალკალოიდები: მიწისზედა ორგანოებში-ატროპინი, ჰიოსცამინი, მიწისქვეშა ორგანოებში: ატროპინი, ჰიოსცამინი და სკოპოლამინი.

In vitro სპეციფიკური ბიოლოგიური ციტოტოქსიკური აქტივობების შეფასებისას Resazurine და Hoechst მეთოდების მიხედვით, *Atropa caucasica* Kreyer. მიწისზედა ორგანოებიდან მიღებულმა ალკალოიდების ჯამურმა სუბსტანციამ გამოავლინა სუსტი ციტოტოქსიკური აქტივობა ნაწლავის ადენოკარცინომისა (DLD-1) და ადამიანის კანის ნორმალურ ფიბრობლასტების (WS-1) მიმართ, ხოლო მიწისქვეშა ორგანოებიდან მიღებულმა ალკალოიდების ჯამურმა სუბსტანციამ გამოამჟღავნა საშუალო შერჩევითი

ციტოტოქსიკურობა უჯრედული კულტურების: A-549 (ფილტვის კარცინომა), DLD-1 მიმართ. ადამიანის კანის ნორმალურ ფიბრობლასტებზე (WS-1) არ აღინიშნა ტოქსიკური მოქმედება.

საკვანძო სიტყვები: ალკალოიდი, კავკასიური შმაგა, ციტოტოქსიკური აქტივობა

გვარი *Atropa*-შმაგას (ოჯ. *Solanaceae*- ძაღლყურღენასებრნი) სახეობები მდიდარია ტროპანის ჯგუფის ალკალოიდებით, რომლებიც ფლობენ სპაზმოლიზურ და ტკივილგამაყუჩებელ მოქმედებას [1,2,3,4]. საქართველოს ტერიტორიაზე გავრცელებულია *Atropa caucasica* Kreyer.- კავკასიური შმაგა [5].

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა საქართველოში მოზარდი *Atropa caucasica* Kreyer. მიწისზედა და მიწისქვეშა ორგანოების შესწავლა ტროპანის ჯგუფის ალკალოიდებზე და მათი ბიოლოგიური აქტივობის დადგენა.

ობიექტები და მეთოდები

კვლევის ობიექტებს წარმოადგენდა საქართველოს ფლორის *Atropa caucasica* Kreyer. მიწისზედა და მიწისქვეშა ორგანოები, შეგროვილი ზედაზენში ნაყოფიანობის ფაზაში. ჰაერმშრალი დაწვრილმანებული მ/ზ და მ/ქ ორგანოებიდან სითხურ-სითხოვანი ექსტრაქციის მეთოდით მიღებულია ალკალოიდშემცველი ჯამური სუბსტანციები. NH_4OH (12%) -ით წინასწარი შეტუტიანებით და დაყოვნებით, ალკალოიდებს ვწვლილავდით ქლოროფორმით. გაერთიანებული ექსტრაქტებს ვასუფთავებდით H_2SO_4 (10%) -ით. მჟავე გამონაწვლილებს ვამუშავებდით ეთილის ეთერით. კონცენტრირებული ამიაკით ვატუტიანებდით pH-9-მდე და ვახდენდით ექსტრაგირებას ორგანული გამსხნელით. ფუძეების ჯამური სუბსტანციების გამოსავალი შეადგენდა: მიწისზედა ორგანოებიდან 0,28%, მიწისქვეშა ორგანოებიდან 0,54% მცენარის ჰ/მ მასალაზე გადაანგარიშები.

კვლევის შედეგი. კავკასიური შმაგას ფიტოქიმიური შესწავლა მოვახდინეთ გაზურ-მას სპექტრალური ქრომატოგრაფიით (GS/MS) და თვისობრივი ანალიზის საფუძველზე - თხელფენოვანი ფრომატოგრაფიული მეთოდით (ფირფიტა *Siliagel*₂₅₄, Merck; სისტემები: I- ბენზოლი-მეთანოლი (1:9), II-აცეტონი-ამიაკის 10% წყალხსნარი (95:5), III- ქლოროფორმი-აცეტონი-ამიაკი 25% (5:4:1), გამამჟღავნებელი: დრაგენდორფის რეაქტივი) ჭეშმარიტ მოწმებთან (ატროპინი, ჰიოსცამინი, სკოპოლამინი) თანდასწრებით. დადგენილია, რომ იდენტიფიცირებული ფუძეები მიეკუთვნებიან ტროპანის ჯგუფს. მიწისზედა ორგანოებიდან მიღებული ალკალოიდების ჯამის პოლიბუფერული დაყოფით გამოყოფილია ატროპინი, ჰიოსცამინი, ხოლო მიწისქვეშა ორგანოებიდან ატროპინი, ჰიოსცამინი და სკოპოლამინი [6]. *Atropa caucasica* Kreyer. მიწისზედა და მიწისქვეშა ორგანოებიდან მიღებული ალკალოიდების ჯამური სუბსტანციების *in vitro* ციტოტოქსიკური აქტივობა შესწავლილი იყო LASEVE-ს ლაბორატორიაში, ფუნდამენტური მეცნიერებათა დეპარტამენტში, კვებეკის უნივერსიტეტში, ქ. შიკუტიმი, კანადა.

ციტოტოქსიკურობა ისაზღვრებოდა in vitro სამ უჯრედულ კულტურაზე: A-549 (ადამიანის ფილტვის კარცინომის უჯრედული კულტურა - ATCC#CCL-185); DLD-1 (სწორი ნაწლავის ადენოკარცინომის უჯრედული კულტურა - ATCC#CCL-221), WS-1 (კანის ნორმალური ფიბრობლასტები), რომლებიც მიღებულია ATCC-დან (American და Type Culture Collection - მანასა, აშშ). სიმსივნური უჯრედები კულტივირებულია Earle მარილთან და L-გლუტამინის შემცველ საკვებ არეში (Earle's მარილი შემადგენლობა: KCl, NaCl, NaH₂PO₄ · H₂O, D-გლუკოზა, MgSO₄ · 7H₂O, CaCl₂ · 2H₂O, NaHCO₃, წითელი ფენოლი), რომელსაც ემატება ემბრიონალური ხბოს 10%-იან შრატი (Hyklon, Logan, ა.შ.შ.) ვიტამინები (1X), პენიცილინი (100 I.U./მლ) და სტრეპტომიცინი (100 მკგ/მლ), ამინომჟავები (1X), ნატრიუმის პირუვატი (Mediaech Cellgro, VA). უჯრედების ინკუბაცია მიმდინარეობს 37°C ტემპერატურაზე, ტენიან ატმოსფეროში CO₂ 5%.

საკვლევი ნიმუშების ციტოტოქსიკური აქტივობა განსაზღვრული იყო Resazurine და Hoechst მეთოდების მიხედვით. აქტივობა განისაზღვრა ინჰიბიტორული კონცენტრაცია 50-ით (იკ50), რომელიც ადგენს საკვლევი ნიმუშების მიერ უჯრედების 50%-ის ინჰიბირების გამომწვევ კონცენტრაციას. სტანდარტად გამოყენებული იყო ეტოპოზიდი [7].

Atropa caucasica Kreyer. მიწისზედა და მიწისქვეშა ორგანოებიდან მიღებული ალკალოიდების ჯამური სუბსტანციების ციტოტოქსიკურ აქტივობაზე ჩატარებული კვლევების შედეგები მოცემულია ცხრილში 1.

ცხრ.1.: *Atropa caucasica* Kreyer. მიწისზედა და მიწისქვეშა ორგანოებიდან მიღებული ალკალოიდების ჯამური სუბსტანციების ციტოტოქსიკური აქტივობა (ინჰიბიტორული კონცენტრაცია 50, მკგ/მლ ექსტრაქტებისთვის და მიკრომოლი ეტოპოზიდისთვის)

№	მცენარე	ვეგეტატიური ნაწილი	ალკალოიდების ჯამში იდენტიფიცირებული ფუძეები	ხაზოვანი უჯრედები და მეთოდები					
				Resazurin			Hoechst		
				A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
1	<i>Atropa caucasica</i> Kreyer	მიწისზედა ორგანოები	ატროპინი, ჰოსცამინი	>200	>200	>200	>200	196±20	167±24
2	<i>Atropa caucasica</i> Kreyer	მიწისქვეშა ორგანოები	ატროპინი, ჰოსცამინი, სკოპოლამინი	135±18	161±24	>200	41±8	48±2	>200
3	ეტოპოზიდი			24±4	10±2	35±16	2,1±0,3	2,1±0,3	31±14

ბიოლოგიური სკრინინგის მონაცემების საფუძველზე გამოვლენილია *Atropa caucasica* Kreyer მიწისზედა ორგანოებიდან მიღებული ალკალოიდების ჯამური სუბსტანციის სუსტი ციტოტოქსიკური აქტივობა (196 მკგ/მლ) ნაწლავის ადენოკარცინომის (DLD-1) და ადამიანის კანის ნორმალური ფიბრობლასტების (WS-1) მიმართ, ხოლო მიწისქვეშა ორგანოებიდან მიღებული ალკალოიდების ჯამურმა სუბსტანციამ გამოავლინა საშუალო შერჩევითი ციტოტოქსიკურობა (41 მკგ/მლ და 48 მკგ/მლ, შესაბამისად) ფილტვის კარცინომას და ნაწლავის ადენოკარცინომას უჯრედების მიმართ. ადამიანის კანის ნორმალურ ფიბრობლასტებზე არ აღინიშნა გამოხატული ციტოტოქსიური მოქმედება.

დასკვნა. ფიტოქიმიური კვლევების შედეგად დადგენილია, რომ *Atropa caucasica* Kreyer სითხე-სითხოვანი ექსტრაქციის მეთოდით მიღებულ გასუფთავებულ ალკალოიდების ჯამურ სუბსტანციებში დომინირებენ ტროპანის ჯგუფის ალკალოიდები: მიწისზედა ორგანოებში - ატროპინი, ჰიოსცამინი, მიწისქვეშა ორგანოებში: ატროპინი, ჰიოსცამინი და სკოპოლამინი.

In vitro ციტოტოქსიკური აქტივობების შეფასებისას Resazurine და Hoechst მეთოდების მიხედვით, კავკასიური შმაგას მიწისზედა ორგანოებიდან მიღებულმა ალკალოიდმემცველმა ჯამურმა სუბსტანციამ გამოამჟღავნა სუსტი ციტოტოქსიკური აქტივობა ნაწლავის ადენოკარცინომისა (DLD-1) და ადამიანის კანის ნორმალური ფიბრობლასტების (WS-1) მიმართ, ხოლო მიწისქვეშა ორგანოებიდან მიღებულმა ალკალოიდმემცველმა ჯამურმა სუბსტანციამ აჩვენა შერჩევითი ციტოტოქსიკურობა ფილტვის და სწორი ნაწლავის სიმსივნური უჯრედული კულტურების მიმართ. ადამიანის კანის ნორმალურ ფიბრობლასტებზე გამოკვეთილი ტოქსიკური მოქმედება არ აღინიშნა.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. Momina Qureshi, Sidharta D., Ray. Belladonna alkaloids. Reference Module in Biomedical Sciences. 2023. <https://doi.org/10.1016/8978-0-12-824315-2.00234-7>.
2. Kevin M. O'Shaughnessy. Cholinergic and antimuscarinic (anticholinergic) mechanisms and drugs. Clinical Pharmacology, 2012, pp.372-381.
3. Brent Furbee. Neurotoxic Plants. Clinical Neurotoxicology. 2009, pp.523-542
4. Guan-hua Du, Yong-xiang Zag. Pharmacological Mechanisms and the Modulation of Pain. Advances in Farmacology. 2016, vol.75, pp.325-361.
5. Gagnidze, R. Vascular plants of Georgia a nomenclatural checklist. Tbilisi. "Universal". 2005, pp. 33-39.
6. Phillipson J.D., Handa S.S. N-Oxides of hyoscyamine and hyoscyne in the Solanaceae. Phytochemistry. 1977, V.14., pp. 999-1003.

7. V.Y. Vachnadze; L.G. Kintsurashvili; N.S. Vachnadze; T.Sh. Suladze; V. Mshvildadze; K. Mchedlidze. Some Alkaloid-Containing Plants Grown And Introduced In Georgia And Their Biological Activities. *Experimental And Clinical Medicine*, 2017, V. 3, pp 1-37.

Alkaloids of ATROPA CAUCASICA KREYER and Their Biological Activity.

¹Lali Kintsurashvili, ²Jean Legault, ^{1,2}Vakhtang Mshvildadze

¹Doctor of Pharmacy, Senior Researcher, I. Kutateladze Institute of Pharmacochimistry, Tbilisi State Medical University, Tbilisi, Georgia; E-mail: l.kintsurashvili@tsmu.edu

²Doctor of Biology; Professor at Fundamental Sciences Department, Université du Québec a Chicoutimi (Canada)

^{1,2}Doctor of Pharmacy, Senior Researcher, I. Kutateladze Institute of Pharmacochimistry, Tbilisi State Medical University, Tbilisi, Georgia; Professor at Fundamental Sciences Department, Université du Québec a Chicoutimi (Canada)

ABSTRACT

The goal of presented research was a study on tropane group alkaloids from the above-ground and underground organs of *Atropa caucasica* Kreyer (Solanaceae) grown in Georgia, and evaluation of their cytotoxic activity. Alkaloid-containing total substances were obtained by liquid-demand extraction from the air-dried comminuted of the above-ground and underground organs of *Atropa caucasica* Kreyer with NH₄OH (12%) pre-elution and delay, we treated the alkaloids with chloroform. The yield of total alkaloids was: From the above-ground organs - 0.28%, from the underground organs - 0.54%, calculated to the air-dried material of the plant. As a result of phytochemical studies on the base of FC-MS and TLC experiments, has been determined the dominated alkaloids of the tropane group in the total sum of purified alkaloids were: atropine and hyoscyamine in above-ground organs and atropine, hyoscyamine and scopolamine in underground organs. In vitro evaluation of cytotoxic activities according to Resazurine and Hoechst experiments demonstrated that the total alkaloid sum obtained from above-ground organs revealed a weak cytotoxic activity against colon adenocarcinoma (DLD-1) and normal human skin fibroblasts (WS-1), and the total alkaloid sum obtained from the underground organs, exhibited a moderate cytotoxic activity against cell cultures of A-549 (lung adenocarcinoma) and DLD-1 without any significant toxicity against normal human skin fibroblasts (WS-1).

KEYWORDS: Alkaloids, *Atropa caucasica*, cytotoxic activity