

საქართველოში გავრცელებული *Delphinium*-დეზურას სახეობების ალკალოიდები და მათი ციტოტოქსიკური აქტივობა

ლალი კინწურაშვილი¹, ჟან ლეგო², ვახტანგ მშვილდაძე³

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.

³ფარმაციის 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 *Delphinium* სახეობების: *Delphinium speciosum* Seed., *Delphinium flexuosum* Bieb., *Delphinium freynii* Conrath., *Delphinium Shmalhauseni* Abov., *Delphinium elisabethae* N.Busch. მიწისზედა და მიწისქვეშა ორგანოების შესწავლა ალკალოიდების შემცველობაზე და მათი ციტოტოქსიკური აქტივობის შეფასება. ჩატარებული ფიტოქიმიური კვლევების შედეგად *Delphinium* ზემოთ ჩამოთვლილი მცენარეებიდან სითხე-სითხოვანი ექსტრაქციის მეთოდით მიღებული გასუფთავებული ალკალოიდების ჯამებში დომინირებენ დიტერპენული ალკალოიდები: მეთილლიკაკონიტინი და ლიკოკტონინი. *In vitro* ციტოტოქსიკური აქტივობის შეფასებისას *Resazurine* და *Hoechst* მეთოდების მიხედვით, *Delphinium Shmalhauseni* Abov. მიწისზედა ორგანოების ალკალოიდების ჯამებმა გამოამჟღავნეს ძლიერი ციტოტოქსიკური აქტივობა A-549 (ადამიანის ფილტვის კარცინომა), DLD-1 (სწორი ნაწლავის ადენოკარცინომა) უჯრედული კულტურის ხაზების მიმართ. ამასთან, სუსტი ტოქსიკურობა აღინიშნა WS-1 (კანის ნორმალური ფიბრობლასტები) უჯრედებზე; საშუალო სიძლიერის ციტოტოქსიკური მოქმედება გამოვლინდა *Delphinium Shmalhauseni* Abov. და *Delphinium freynii* Conrath. მიწისქვეშა ორგანოების ალკალოიდების ჯამის შემთხვევაში, ხოლო A-549 უჯრედების მიმართ სუსტად გამოხატული ციტოტოქსიკური აქტივობა აჩვენებს *Delphinium elisabethae* N.Busch. ალკალოიდებმა.

საკვანძო სიტყვები: ალკალოიდი, დეზურა, *Delphinium*, *Helleboraceae*, ციტოტოქსიკური აქტივობა.

ონკოლოგიურ პრაქტიკაში ფართოდ გამოიყენებულ ქიმიოთერაპიულ საშუალებებს შორის მნიშვნელოვანი ადგილი უჭირავთ პრეპარატებს, რომლებიც დამზადებულია სამკურნალწამლო მცენარეულ ნედლეულზე და მათგან გამოყოფილი ბუნებრივ შენაერთებზე. ამიტომ ალკალოიდშემცველი მცენარეების ახალი რესურსების ძიება აქტუალურია. ცნობილია, რომ დეზურას *Delphinium* (ოჯ. *Helleboraceae*) სახეობები მდიდარია დიტერპენული ალკალოიდებით, რომლებიც ლიტერატურული მონაცემების თანახმად, ფარმაკოლოგიური მოქმედების ფართო სპექტრით ხასიათდებიან: კურარეს მსგავსი, ანთებისსაწინააღმდეგო, ტკივილგამაყუჩებელი, ანტიარითმიული, სიმსივნის საწინააღმდეგო, ანტიდოტური და ინსექტიციდური [1-5].

ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა საქართველოში მოზარდი დეზურას სახეობების მიწისზედა ორგანოების შესწავლა ალკალოიდების შემცველობაზე და მათი ციტოტოქსიკური აქტივობის შეფასება.

საქართველოში გვარი *Delphinium* წარმოდგენილია 18 სახეობით, რომლებიც ალკალოიდების შემცველობაზე ნაკლებად იყო შესწავლილი [6].

კვლევის მასალა და მეთოდები:

კვლევის ობიექტებს წარმოადგენდა საქართველოში მოზარდი *Delphinium* სახეობების: *Delphinium speciosum* Seed., *Delphinium flexuosum* Bieb., *Delphinium freynii* Conrath., *Delphinium Shmalhauseni* Abov., *Delphinium elisabethae* N.Busch. მიწისზედა და მიწისქვეშა ორგანოები, შეგროვილი ყვავილობის ფაზაში საქართველოს სხვადასხვა რეგიონში (იხ. ცხრილი 1).

ალკალოიდების ჯამის მიღება მოვახდინეთ სითხურ-სითხოვანი ექსტრაგირების მეთოდით: ჰაერმშრალი დაწვრილმანებული ნედლეულის წინასწარი შეტუტიანება ნატრიუმის კარბონატის 5% ხსნარით და გამოწვლილვა ქლოროფორმით. მიღებული ექსტრაქტები გავასუფთავეთ გოგირდმჟავას 5% ხსნარით, გამონაწვლილები დავამუშავეთ ეთილის ეთერით, შევატუტიანეთ ნატრიუმის კარბონატით PH-9-მდე და ექსტრაგირება მოვახდინეთ ორგანული გამსხნელით. მიღებული ალკალოიდების ჯამების გამოსავალი პროცენტებში, მცენარის 3/მ მასალაზე გადაანგარიშებით, მოცემულია ცხრილში 1. ალკალოიდების

ჯამები დავყავით ფრაქციონირებით ფუძიანობის მიხედვით pH 2,0-10,0 (ბიჯი1,0). ფრაქციები გავასუფთავეთ აცეტონით და გადავკარისტალეთ მეთანოლით [7,8].

გამოყოფილი ფუძეების იდენტიფიკაცია მოვახდინეთ ალკალოიდების ჭეშმარიტ ნიმუშებთან ლღობის ტემპერატურის შერეული სინჯის (Wenk LabTec, Germany), GC/MS სპექტრალური და თვისობრივი ანალიზების საფუძველზე - თფქ მეთოდით (ფირფიტა Siliagel²⁵⁴, Merck; სისტემები: I-II-ქლოროფორმი-მეთანოლი (6:1; 4:1); დეტექტორი: დრაგენდორფის რეაქტივი) ჭეშმარიტ მოწმეებთან თანდასწრებით. *Delphinium* სახეობებიდან მიღებული ალკალოიდების ჯამები შესწავლილი იყო in vitro ციტოტოქსიკურ აქტივობაზე LASEVE-ს ლაბორატორიაში, ფუნდამენტალური მეცნიერებების დეპარტამენტში, კვებეკის უნივერსიტეტში, ქ. შიკუტიმი, კანადა.

ანალიზი შესრულდა 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 ინჰიბიტორული კონცენტრაციით (IC₅₀), რომელიც ახდენს უჯრედების 50% ზრდის ინჰიბირებას. საკონტროლო ნიმუშად გამოიყენებული იყო ეტოპოზიდი და დაუნორუბიციინი [9,10].

შედეგები და განხილვა. ჩატარებული კვლევების საფუძველზე დადგენილია, რომ საქართველოში მოზარდი *Delphinium* ზემოთჩამოთვლილი სახეობები შეიცავენ დიტერპენულ ალკალოიდებს. იდენტიფიცირებული ფუძეების ჩამონათვალი მოცემულია ცხრილში1. მიღებულ ალკალოიდების ჯამებში დომინირებენ ფარმაცოლოგიურად აქტიური მეთილლიკაკონიტინი და ლიკოკტონინი. ალკალოიდშემცველი ჯამების in vitro ციტოტოქსიკური აქტივობის შესწავლის შედეგები მოცემულია ცხრილში 2.

ცხრილი 1. *Delphinium* სახეობების ალკალოიდების ჯამებში იდენტიფიცირებული ალკალოიდები.

<i>Delphinium</i> <i>m</i> დეზურას სახეობები	მცენარის შეგროვების ადგილი და ვეგეტაციის ფაზა	ალკალოიდების ჯამი %, ჰაერ/ მშრალ ნედლეულზე გადაანგარიშებით		დეზურას სახეობებში იდენტიფიცირებული ალკალოიდები	
		მიწისზედა ორგანოები	მიწისქვეშა ორგანოები	მიწისზედა ორგანოები	მიწისქვეშა ორგანოები
<i>Delphinium speciosum</i> Seed	ციხისჯვარი, ყვავილობის ფაზა	0,46	0,71	მეთილლიკაკონი- ნი, გიგაქტონინი, ლიკოკტონინი, ლიკაკონი-ტინი	მეთილლიკაკონი- ტინი, ლიკოკტონინი,
<i>Delphinium flexuosum</i> Bieb.	ბაკურიანი ყვავილობის ფაზა	1,03	1,20	მეთილლიკაკონი- ნი, დელკოზინი, ლიკოკტონინი, ანტრანოილლიკოკ- ტონინი, ზონგორინი	მეთილლიკაკონი- ტინი, ანტრანოილლიკოკ- ტონინი, დელკოზინი, ლიკოკტონინი, ნორზონგორამინი, ზონგორინი, დელექტინი
<i>Delphinium freynii</i> Conrath.	კოჯორი, ყვავილობის ფაზა	0,25	0,45	დელფრენინი, დელფ- ლექსინი, ზონგორამინი, ნორზ- ონგორინი, ნორზონგორამინი	მეთილლიკაკონი- ტინი, ანტრანოილლიკოკ- ტონინი, ლიკოკტონინი,
<i>Delphinium Shmalhaus- nii</i> Abov,	თეთრიწყა- რო, ყვავილ- ობის ფაზა	0,62	0,75	მეთილლიკაკონი- ნი, ანტრანოილლიკოკ- ტონინი, ლიკოკტონინი,	მეთილლიკაკონი- ტინი, ლიკოკტონინი,
<i>Delphinium. elisabethaei</i> N.Busch.	ბორჯომი, ყვავილობის ფაზა	0,32	0,89	მეთილლიკაკონი- ნი, ანტრანოილლიკოკ- ტონინი, ლიკოკტონინი,	მეთილლიკაკონი- ტინი, ლიკოკტონინი, ანტრანოილლიკოკ- ტონინი,

ცხრილი 2. *In vitro* ალკალოიდმემცველი ჯამების ციტოტოქსიკური აქტივობა (IC50, µg/ml)

მცენარე	ვეგეტატიური ორგანოები	ხაზოვანი უჯრედები და მეთოდები					
		<i>Resazurin</i>			<i>Hoechst</i>		
		A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
<i>Delphinium speciosum</i> Seed .	მიწისზედა ორგანოები	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml
<i>Delphinium speciosum</i> Seed	მიწისქვეშა ორგანოები	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml
ეტოპოზიდი		>50 µM	12±2 µM	>50 µM	18±6 µM	4,1±0,8 µM	>50 µM
<i>Delphinium flexuosum</i> Bieb	მიწისზედა ორგანოები	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml
<i>Delphinium flexuosum</i> Bieb	მიწისქვეშა ორგანოები	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml
<i>Delphinium freynii</i> Conrath	მიწისზედა ორგანოები	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	196±20 µg/ml	167±24 µg/ml
<i>Delphinium freynii</i> Conrath	მიწისქვეშა ორგანოები	135±18 µg/ml	161±24 µg/ml	>200 µg/ml	41±8 µg/ml	48±2 µg/ml	>200 µg/ml
Delphinium Shmalhauseni Abov.	მიწისზედა ორგანოები	6,1±0,2 µg/ml	9,2±0,9 µg/ml	>200 µg/ml	11±1 µg/ml	33±5 µg/ml	>200 µg/ml
Delphinium Shmalhauseni Abov.	მიწისქვეშა ორგანოები	48±5 µg/ml	59±7 µg/ml	57±6 µg/ml	69±5 µg/ml	81±14 µg/ml	139±11 µg/ml
Delphinium elisabethaei N.Busch	მიწისზედა ორგანოები	159±12 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	92±14 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml
დაუნორუბიციინი Daunorubicin		0,68 ± 0,08 µM	<0,078 µM	0,12 ± 0,02 µM	<0,078 µM	<0,078 µM	0,13 ± 0,03 µM

დასკვნა. საქართველოში მოზარდი *Delphinium* სახეობების: *Delphinium speciosum* Seed., *Delphinium flexuosum* Bieb., *Delphinium freynii* Conrath., *Delphinium Shmalhausenii* Abov., *Delphinium elisabethaei* N.Busch. მიწისზედა და მიწისქვეშა ორგანოების სითხე-სითხოვანი ექსტრაქციის მეთოდით მიღებული ალკალოიდების ჯამების ფიტოქიმიური შესწავლის საფუძველზე დადგენილია, რომ ალკალოიდები მიეკუთვნებიან დიტერპენულ ჯგუფს, მათ შორის დომინანტი ფუძეებია: ფარმაკოლოგიურად აქტიური მეთილლიკაკონიტინი და ლიკოკტონინი.

ალკალოიდმემცველი ჯამების *in vitro* ციტოტოქსიკური აქტივობის შესწავლის შედეგად გამოვლენილია: *Delphinium Shmalhausenii* Abov. მიწისზედა ორგანოებიდან მიღებული ალკალოიდების ჯამის მკვეთრად გამოხატული ციტოტოქსიკური აქტივობა A-549 (ადამიანის ფილტვის კარცინომის), DLD-1 (სწორი ნაწლავის ადენოკარცინომის) უჯრედული კულტურის ხაზების მიმართ. აღსანიშნავია ალკალოიდების ჯამის სუსტი ტოქსიკურობა WS-1 (კანის ნორმალური ფიბრობლასტები) უჯრედების მიმართ; საშუალო სიძლიერის ციტოტოქსიკური მოქმედება გამოამჟღავნეს *Delphinium Shmalhausenii* Abov. და *Delphinium freynii* Conrath მიწისქვეშა ორგანოების ალკალოიდებმა. A-549 უჯრედების მიმართ სუსტად გამოხატული ციტოტოქსიკურობა აჩვენა *Delphinium.elisabethaei* N.Busch. ალკალოიდების ჯამმა.

გამოყენებული ლიტერატურა:

1. Liu, F.; Yang, C.H.; Liang, J.Y.; Liu, J.H. Advances in the studies on the pharmacological activities and toxicities of C19 diterpenoid alkaloids. Strait Pharm. J. 2012, 24, 1–5.
2. Wang, J.L.; Shen, X.L.; Chen, Q.H.; Wang, W.; Wang, F.P. Structure-analgesic Activity Relationship Studies on the C18-and C19-Diterpenoid Alkaloids. Chem. Pharm. Bull. 2009, 57, 801–807.
3. Faridi, B.; Zello, A.; Touati, D.; Alaoui, K.; Cherrah, Y. Toxicite aigue et activite anti-inflammatoire des grains de Delphinium staphysagria. Phytotherapie 2014, 12, 175–180.
4. Xu, T.F.; Liu, S.; Meng, L.L.; Pi, Z.F.; Liu, Z.Q. Bioactive heterocyclic alkaloids with diterpene structure isolated from traditional Chinese medicines. J. Chromatogr. B 2016, 1026, 56–66.
5. Кобелянская Л. Г. Применение метилликаконитина в клинике нервных болезней при спастических парезах. Фармакология и Токсикология. 1959. №1. с. 38-42.
6. Gagnidze, R. Vascular plants of Georgia a nomenclatural checklist. Tbilisi.: “Universal” 2005, “Universal”, 247

7. L. Kintsurashvili, K. Mulkijanyan, N. Gogitidze, N. Mushkiashvili. Alkaloids from the Aerial Parts of Larkspur (*Delphinium speciosum* Beeb.) and their Pharmacological Activity. *Ijppr.Human*. 2020,v.18,(4), 204-211.
8. L. Kintsurashvili, N.Gogitidze, N. Mushkiashvili, K. Mulkijanyan. Alkaloids of aboveground organs of *Delphinium freynii* Conrath., common in Georgia and their analgesic activity. *Scientific-Practical Journal, LTD "Interfarmi+"*. *Experimental & Clinical Medicine*, 2023, 2, 21-25
9. Oueslati S, Ksouri R, Falleh H, Pichette A, Abdelly C, Legault J. Phenolic content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the edible halophyte *Suaeda fruticosa* Forssk. *Food Chemistry*. 2012;132(2):943-947. doi:10.1016/j.foodchem.2011.11.072
10. Debiton E, Madelmont JC, Legault J, Barthomeuf C. Sanguinarine-induced apoptosis is associated with an early and severe cellular glutathione depletion. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2003;51(6):474-482. doi:10.1007/s00280-003-06099

Alkaloids of *Delphinium* species distributed in Georgia and their cytotoxic activity

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

¹TSMU I. Kutateladze Institute of Pharmacochimistry, Tbilisi, Georgia

²Université du Québec a Chicoutimi, Chicoutimi, Québec, Canada

Abstract

The aim of the study was investigation the above and underground organs of *Delphinium* species distributed in Georgia: *Delphinium speciosum* Seed., *Delphinium flexuosum* Bieb., *Delphinium freynii* Conrath., *Delphinium Shmalhausenii* Abov., *Delphinium elisabethaei* N.Busch. for the content of alkaloids and to evaluate their cytotoxic activity. Of as a result phytochemical studies was conducted, in the total purified alkaloids obtained from the above-mentioned *Delphinium* plant species by liquid-liquid extraction method dominate diterpene alkaloids: methyllycaconitine and lycocotonin. Evaluation *in vitro* cytotoxic activity by *Resazurin* and *Hoechst* methods, in the case of the sum of alkaloids from above-ground organs of *Delphinium Shmalhausenii* Abov. revealed significant cytotoxic activity against A-549 (human lung carcinoma) and DLD-1 (rectal adenocarcinoma) cell culture lines with weak toxicity toward WS-1 (normal skin fibroblast) cells ; Alkaloids from underground organs of *Delphinium Shmalhausenii* Abov. and *Delphinium freynii* Conrath. Exhibited a moderate cytotoxicity; Weak expressed cytotoxic activity against A-549 cell lines was detected in the case of *Delphinium elisabethaei* N.Busch. alkaloids.