

ՀՏԴ 615.322, 616.36-004, 543.545.2

**Շիճուկային սպիտակուցների էլեկտրաֆորետիկ
ցուցանիշների գնահատումը՝ որպես ֆլամին/սիլիմարին
բուսական խառնուրդի բուժական էֆեկտիվության
գնահատման ցուցանիշ տոքսիկ ցիռոզի պայմաններում**

**Լ.Մ. Արշակյան, Հ.Ա. Հարությունյան, Ս.Ա. Բուլոյան,
Ա.Ե. Պողոսյան, Հ.Վ. Գասպարյան**

*ՀՀ ԳԱԱ օրգանական և դեղագործական քիմիայի
գիտատեխնոլոգիական կենտրոն,
0014, Երևան, Ազատության պող., 26*

Բանալի բառեր. շիճուկային սպիտակուցներ, ֆլամին/սիլիմարին, ալ-բումին, տոքսիկ ցիռոզ, մազանթային էլեկտրաֆորեզ

Ներածություն

Տարբեր պատճառաբանություններով լյարդի հիվանդությունները հաճախ հանդիպող ախտաբանական պրոցեսներ են, ինչը ստիպում է կլինիցիստներին հիվանդության ախտորոշման համար կիրառել ժամանակակից բժշկա-կենսաբանական զանազան մեթոդներ՝ ընդգրկելով ինչպես ինվազիվ, այնպես էլ ոչ ինվազիվ մեթոդներ: Այդ տեսանկյունից լյարդի ցիռոզի ախտորոշման և կանխատեսման համար մշակվել են մի քանի ոչ ինվազիվ մեթոդներ, որոնք ներառում են մի շարք շիճուկային մարկերներ [4]:

Գրական տվյալների վերլուծությունը ցույց է տալիս, որ շիճուկային սպիտակուցների որակական և քանակական որոշումը՝ որպես ոչ ինվազիվ եղանակ, կարևոր նշանակություն ունի տարբեր հիվանդությունների և ախտաբանական պրոցեսների որոշման, ախտորոշման և մոնիթորինգի համար [1, 11]:

Հայտնի է նաև, որ շիճուկային սպիտակուցների և դրանց էլեկտրաֆորետիկ ցուցանիշների գնահատումը հաստատված լաբորատոր մեթոդ է մի շարք հիվանդությունների ախտորոշման համար, որն

արտահայտվում է ինչպես ալբումինի կոնցենտրացիաների, այնպես էլ **ալբումին/գլոբուլին հարաբերակցության (ԱԳՀ)** ցուցանիշով:

Վերևում նշվածները հիմնավորվում են նրանով, որ շիճուկային (պլազմային) սպիտակուցները մասնակցում են օրգանիզմի օրգան-համակարգերի սնուցման, ավելի փոքր իոնների և մոլեկուլների տեղափոխման, օսմոտիկ ճնշման պահպանման, թթվահիմնային բուֆերային հավասարակշռության, հեմոստազի և իմունային սպիտակուցների պաշտպանողական մեխանիզմներին [5]:

Բազմաթիվ զարգացած երկրներում մազանոթային էլեկտրաֆորեզի միջոցով ուսումնասիրության մեթոդը հաստատված է և արդյունավետ, որը լայնորեն կիրառվում է որպես սկրինինգային եղանակ՝ սպիտակուցային փոխանակության խանգարումների հետ կապված բազմաթիվ հիվանդությունների կլինիկական ախտորոշման համար [6, 10]:

Ալբումինը՝ որպես շիճուկային սպիտակուց, համարվում է պլազմային կրիտիկական, որը սինթեզվում է լյարդի կողմից, և նրա կոնցենտրացիայի նվազումը կարող է հանգեցնել հաճախ հանդիպող անպրոտեինեմիայի: Բացի դրանից, հիպոալբումինեմիայի առաջացման պատճառ կարող են հանդիսանալ լյարդի որոշ հիվանդություններ, ինչպիսիք են՝ քրոնիկ հեպատիտը, ցիրոզը և այլն, որտեղ հեպատոցիտներում նկատվում են ալբումինների արտադրողականության նվազման երևույթներ [8]:

Պարզվել է, որ լյարդի ցիրոզ հիվանդությանը բնորոշ է հեպատոցիտներում ալբումինի կոնցենտրացիայի նվազում, որը կապված է ոչ միայն ալբումինի սինթեզի նվազման, այլև նրա կառուցվածքի և ֆունկցիոնալ առանձնահատուկ փոփոխությունների հետ, ինչպիսիք են պոստորանսկրիպցիոն փոփոխությունները և օքսիդատիվ վնասումը [7, 9]:

Պետք է եզրակացնել, որ լյարդը օրգանիզմի հոմեոստազի ապահովման ամենակարևոր օրգաններից մեկն է, ուստի լյարդի հիվանդությունների և հատկապես ցիրոզի կանխատեսման ու ախտորոշման, ինչպես նաև նոր միացությունների բուժական էֆեկտիվության ուսումնասիրության և հայտնաբերման համար կարևոր է շիճուկային սպիտակուցների էլեկտրաֆորետիկ ցուցանիշների գնահատումը էլեկտրաֆորեզի եղանակով:

Ներկայացված աշխատանքի նպատակն է գնահատել բուսական ծագում ունեցող ֆլամին/սիլիմարին խառնուրդի բուժական ազդեցությունը լյարդի տոքսիկ ցիրոզի զարգացման պայմաններում՝ շիճուկային սպիտակուցների էլեկտրաֆորետիկ ցուցանիշների գնահատմամբ:

Նյութը և մեթոդները

Հետազոտության օբյեկտ են հանդիսացել 200-220գ քաշով լաբորատոր սպիտակ ոչ գծային առնետները: Կենդանիների հետ վարվելաձևերը համապատասխանել են Եվրախորհրդի կողմից հաստատված Directive 2001/20/EC պահանջներին:

Հետազոտության մոդելավորումը

Փորձարարական կենդանիները բաժանվել են երեք խմբի՝ յուրաքանչյուրում 6 կենդանի. *խումբ I* – ինտակտ խումբ (առողջ կենդանիներ), *խումբ II* – ստուգիչ խումբ (թունավորում CCl_4 -ով՝ 2 շաբաթ տևողությամբ), *խումբ III* – CCl_4 -ով 2 շաբաթ թունավորելուց հետո բուժում *Ֆլամին-սիլիմարինով* (1:2), (4 շաբաթ տևողությամբ):

Լյարդի տոքսիկ ցիռոզի մոդելավորումը

Լյարդի ցիռոզի մոդելներն ինդուկցվել են CCl_4 -ի 30%-անոց լուծույթի ներորովայնային ներարկումներով: Այն տրվել է 2 մլ/կգ դոզաչափով՝ 2 շաբաթ տևողությամբ, շաբաթական 2 անգամ հաճախականությամբ:

Ֆլամին-սիլիմարին խառնուրդի պատրաստումը

Ֆլամին-սիլիմարինի թարմ խառնուրդը պատրաստվել է ձիթալուծում 1:2 հարաբերակցությամբ: Բուժման ընթացքում կենդանիները խառնուրդը պերօրալ ճանապարհով ստացել են 300 մգ/կգ դոզաչափով:

Շիճուկային սպիտակուցների հետազոտություն

Նմուշապատրաստում: Կենդանիներից արյունը հավաքվել է սրտի պունկցիայի միջոցով մեկանգամյա օգտագործման ներարկիչի օգնությամբ՝ առանց կոագուլյանտի օգտագործման: Շիճուկի անջատման համար թողնվել է -4°C ջերմաստիճանում մի քանի ժամ: Այնուհետև ցենտրիֆուգվել է 5000պտ/ր պայմաններում 10 րոպե տևողությամբ: Արդյունքում շիճուկն անջատվել է արյան ձևավոր տարրերից [2]:

Ընդհանուր սպիտակուցների քանակություն: Շիճուկի նմուշներում ընդհանուր սպիտակուցների քանակական հետազոտությունների համար օգտագործվել է սպեկտրաֆոտոմետրիկ անալիզի մեթոդը UV-VIS spectrophotometer LB-30 SSPS սարքավորման միջոցով: Նմուշները հետազոտվել են 260 նմ և 280 նմ ալիքների երկարության տակ, իսկ ընդհանուր սպիտակուցների քանակները հաշվարկվել են հետևյալ բանաձևով՝

սպիտակուցի քանակ (մգ/մլ) = $(1,55 \times A280) - (0,76 \times A260) \times$ նոսրացման գործակից,

որտեղ 1,55 և 0,76 — 280 և 260 նմ ալիքի երկարությունների համապատասխան հաստատումներ:

Մազանոթային էլեկտրաֆորեզի գործիքավորում: Մազանոթային էլեկտրաֆորեզն իրականացվել է Hewlett-Packard HP3D Agilent 1600A սարքավորման միջոցով: Օգտագործվել է 48,5սմ ընդհանուր երկարությամբ և 40սմ էֆեկտիվ երկարությամբ, 50 մկմ լայնությամբ պարզաձույլ կվարցային մազանոթ:

Ընթացքի հաջորդականություն: Որպես բաժանող էլեկտրոլիտ օգտագործվել է 30մՄ Բորատ դեկահիդրատ բուֆեր (pH=9,5), որի pH-ը կարգավորվել է 1Ն NaOH-ի ջրային լուծույթով: Բաժանումն իրականացվել է բարձր լարման պայմաններում: Յուրաքանչյուր բաժանումից առաջ մազանոթը լվացվել է 3ր 0,1 Ն NaOH-ի լուծույթով, 3ր դեիոնիզացված ջրով և 5ր բաժանող էլեկտրոլիտով: Ներարկումն իրականացվել է հիդրոդինամիկ եղանակով: Քրոմատոգրաման հետազոտություններն իրականացվել են դետեկտորի որոշման 190–600 նմ ալիքի երկարության տիրույթում: Որպես ստանդարտ օգտագործվել է եզան շիճուկային ալբումինի (BSA) 1մգ/մլ ջրային լուծույթը: Արյան շիճուկի նմուշները լուծվել են դեիոնիզացված ջրում 1:39 հարաբերությամբ [2]: Բոլոր նմուշները ներարկումից առաջ ֆիլտրվել են ներարկիչի համար նախատեսված 0,45մկմ մեկանգամյա օգտագործման ֆիլտրերով:

ԱԳՀ (ալբումին/գլոբուլին հարաբերակցության) որոշման հաշվարկն իրականացվել է ըստ համապատասխան էլեկտրաֆորեզրամաների պիկերի մակերեսների թվաբանական արժեքների:

Արդյունքները և քննարկումը

Շիճուկային սպիտակուցների և դրանց էլեկտրաֆորետիկ ցուցանիշների գնահատումը մարդկանց և կենդանիների մոտ մի շարք հիվանդությունների ախտորոշման համար հայտնի, մշակված լաբորատոր մեթոդ է, որը փոխարինում է ալբումինի քանակության կենսաքիմիական հետազոտությունների ալբումին/գլոբուլին հարաբերակցության հաշվարկով [11, 12]:

Վերջինս կարևոր բիոմարկեր է լյարդի հիվանդությունների ախտորոշման համար: Ուստի մեր կողմից մշակվել և օպտիմալացվել է ժամանակակից մազանոթային էլեկտրաֆորեզի մեթոդը՝ որպես ավելի արագ և ճշգրիտ մեթոդ, առնետի շիճուկային սպիտակուցների բաժանման համար, որը կիրառվել է ԱԳՀ (ալբումին/գլոբուլին հարաբերության) ցուցանիշների գնահատման նպատակով:

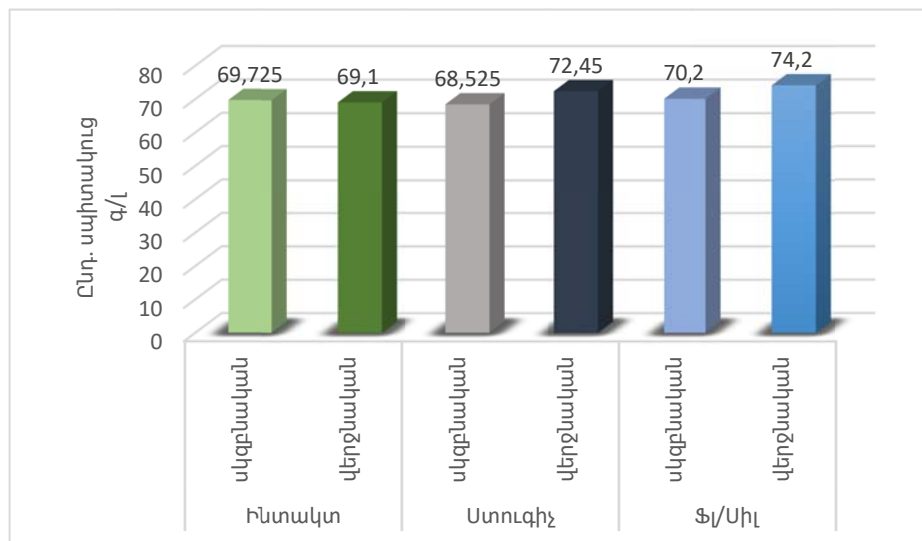
Մեր կողմից նախկինում իրականացված մեթոդի զարգացման և օպտիմալացման հետազոտությունները ցույց են տվել, որ ալբումինի ստանդարտի, ինչպես նաև առնետի շիճուկային սպիտակուցների բաժանումն առավել արդյունավետ է էլեկտրոլիտի 30մմոլ/լ կոնցենտրացիայի և հիդրոդինամիկ 45 Մբար ներարկման պայմաններում [1]:

Ներկայացված աշխատանքի հետազոտվող խմբերի առնետների (ինտակտ, ստուգիչ և բուժական) արյան շիճուկային սպիտակուցների էլեկտրաֆորեզրամաները ներկայացված են նկ. 2, 3 և 4-ում, որի պիկերի մակերեսների քանակական ցուցանիշներով որոշվել է ալբումին/գլոբուլին հարաբերակցության գործակիցը:

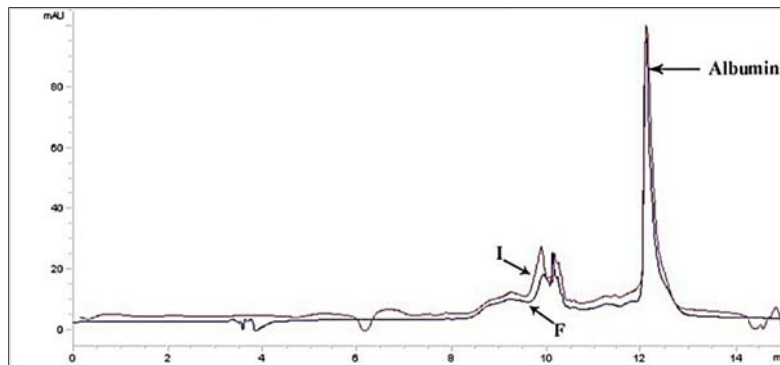
Հետազոտության արդյունքներից պարզվեց, որ ինտակտ (առողջ) կենդանիների մոտ փորձի առաջին և վերջին օրերին ընդհանուր սպիտակուցների քանակի և ԱԳՀ-ի ցուցանիշների նկատելի փոփոխություններ չեն գրանցվել:

Ինչ վերաբերում է ցիռոզով հիվանդ ստուգիչ խմբի կենդանիներին, որոնք երկու շաբաթ թունավորվել են քառաքլոր ածխածնով, սպիտակուցների ընդհանուր քանակական ցուցանիշները բարձրացել են, իսկ ԱԳՀ մակարդակը, ընդհակառակը, նկատելիորեն նվազել է:

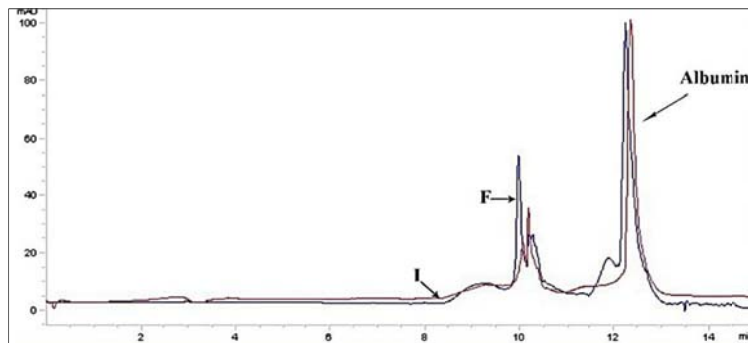
Բուժական խմբի կենդանիների մոտ ֆլամին/սիլիմարինի ազդեցության պայմաններում սպիտակուցների ընդհանուր քանակական ցուցանիշների բարձրացմանը զուգահեռ բարձրացել է նաև ԱԳՀ ցուցանիշը, ի տարբերություն ստուգիչ խմբի, ինչը վկայում է օրգանիզմում բորբոքային ախտաբանական պրոցեսների նվազման մասին (նկ. 1, 5):



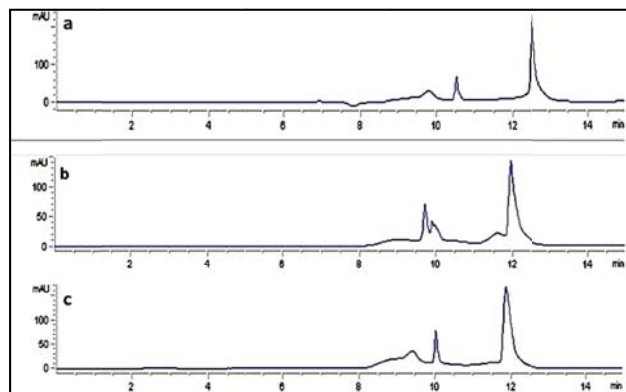
Նկ.1. Փորձարարական խմբերի առնետներից վերցված արյան շիճուկում պարունակվող ընդհանուր սպիտակուցների քանակություն:



Նկ. 2. *Խումբ I* (ինտակտ) կենդանիների շիճուկային սպիտակուցների բաժանումը մազանոթային էլեկտրաֆորեզի եղանակով.
I – սկզբնական, F – վերջնական:



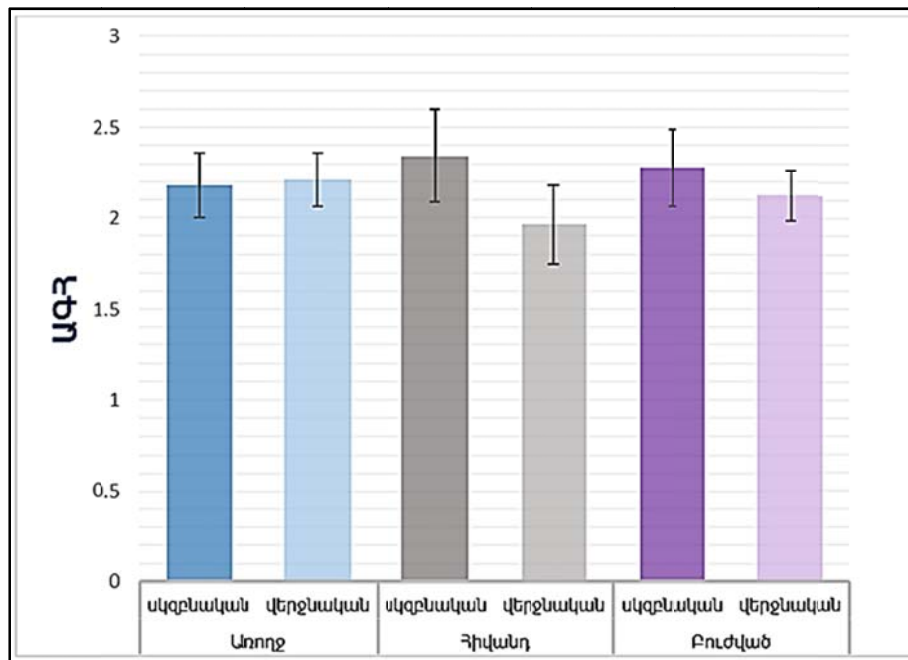
Նկ. 3. *Խումբ III* (ցիռոտիկ) շիճուկային սպիտակուցների բաժանումը մազանոթային էլեկտրաֆորեզով.
I – սկզբնական, F – վերջնական:



Նկ. 4. *Խումբ III*

(բուժական) կենդանիների շիճուկային սպիտակուցների բաժանումը մազանոթային էլեկտրաֆորեզի եղանակով:

a – սկզբնական՝ փորձի 1-ին օր, b – 2-շաբաթյա ինտոքսիկացիայից հետո, c – վերջնական՝ 4 շաբաթ ֆլամին/սիլիմարինով բուժվելուց հետո:



Նկ. 5. Փորձաքարական խմբերի առնետներից վերցված արյան շիճուկում պարունակվող **ԱԳՀ** (ալբումին/գլոբուլին հարաբերությունը)՝ հաշվարկված ըստ էլեկտրաֆորեզրամանների պիկների մարեաների:

Հայտնի է, որ շիճուկային սպիտակուցների մեծ մասը սինթեզվում են լյարդի կողմից, ուստի արյան շիճուկային սպիտակուցների քանակական շեղումների (թունավորման ընթացքում) մասնակի վերականգնումը բուժումից հետո վկայում է ֆլամին/սիլիմարին բուսական խառնուրդի բուժական էֆեկտիվության մասին: Հետագա ավելի խոր և բազմակողմանի ուսումնասիրությունները թույլ կտան ֆլամին/սիլիմարինն առաջադրել որպես նոր համակցված (կոմբինացված) բուսական հեպատոպրոտեկտոր:

Ընդունված է 06.10.21

Оценка электрофоретических исследований сывороточных белков, как показатель терапевтической эффективности растительной смеси фламин/силимарин при токсическом циррозе печени

**Л.М. Аршакян, А.А. Арутюнян, С.А. Булоян, А.Е. Погосян,
Г.В.Гаспарян**

Заболевания печени различного происхождения являются распространенными патологическими процессами, что вынуждает клиницистов использовать современные медико-биологические методы как инвазивные, так и неинвазивные для диагностики заболевания. Одним из таких методов является оценка белков сыворотки крови и их электрофоретические особенности.

Известно, что большая часть белков сыворотки крови синтезируется в печени, поэтому частичное восстановление количественных отклонений белков сыворотки крови (при интоксикации), в частности повышение уровня соотношения альбумина-глобулина под действием фламина/силимарина, указывает на терапевтическую эффективность данной растительной смеси. Можно заключить, что дальнейшие более углубленные исследования позволят предложить фламин/силимарин в качестве нового комбинированного растительного гепатопротектора.

Evaluation of Serum Protein Electrophoretic Pattern as an Indicator of Therapeutic Efficacy of Flamin/Silymarin Herbal Mixture in Toxic Cirrhosis

**L. M. Arshakyan, H. A. Harutyunyan, S.A. Buloyan, A. E. Poghosyan,
H. V. Gasparyan**

Liver diseases of various origins are common pathological processes that compel clinicians to use contemporary, both invasive and non-invasive, medical and biological methods to diagnose the disease. One of these methods is the assessment of serum proteins and their electrophoretic characteristics.

It is known that most of the serum proteins are synthesized in the liver, therefore, the partial recovery of quantitative deviations of blood serum protein (during intoxication), in particular, the increase in the AGR (albumin-globulin ratio) level after treatment with Flamin/Silymarin mixture indicates the therapeutic efficacy of suggested herbal mixture. Further in-depth studies will allow Flamin/Silymarin to be proposed as a new combined herbal hepatoprotective drug.

Գրականություն

1. Alberghina D., Giannetto C., Vazzana I., Ferrantelli V., Piccione G. Reference Intervals for Total Protein Concentration, Serum Protein Fractions, and Albumin/Globulin Ratios in Clinically Healthy Dairy Cows. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2011, 23, 111-114 <https://doi.org/10.1177/104063871102300119>
2. Antai AB, Eyong EU, Eteng MU, Itam EH, Eko ME, Ita SO. Serum protein and enzyme levels in rats following administration of ethanolic leaf extract of *Ageratum conyzoides* (goat weed). *Niger J Physiol Sci*. 2009 Dec;24(2):117-20. doi: 10.4314/njps.v24i2.52900. PMID: 20234750.
3. Arshakyan L.M. Separation of Rat Serum Proteins by Capillary Zone Electrophoresis (CZE). Comparison of electrophoretic properties of RSA and BSA. *Blood* 2 (24) 2017, p. 39-43.
4. Nishikawa H, Osaki Y. Liver Cirrhosis: Evaluation, Nutritional Status, and Prognosis. *Mediators Inflamm.*, 2015, 2015:872152. doi:10.1155/2015/872152
5. Eckersall PD. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (eds) *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6th edn. Academic Press., 2008, Elsevier Inc., USA, pp 117–155. ISBN: 9780080568829
6. Elkhair, N.M. Serum protein capillary electrophoretic pattern during the neonatal period in dairy calves. *Comp Clin Pathol* 30, 2021, pp. 17–23. <https://doi.org/10.1007/s00580-020-03184-y>
7. Jalan R, Bernardi M. Effective albumin concentration and cirrhosis mortality: from concept to reality. *J Hepatol.*, 2013 Nov, 59(5):918-20. doi: 10.1016/j.jhep.2013.08.001]
8. Lee JS. Albumin for end-stage liver disease. *Korean J Intern Med.*, 2012, 27(1):13-19. doi:10.3904/kjim.2012.27.1.13
9. Robbins basic pathology / [edited by] Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Jon C. Aster., 9th. ed. pp. 603-609. ISBN 978-0-8089-2432-6
10. Rukhsana Jabeen, Debora Payne, John Wiktorowicz, Amin Mohammad, John Petersen, Capillary electrophoresis and the clinical laboratory. Vol. 27 (12). Special Issue: Pharmaceutical analysis., 2006, pp.. 2413-2438. <https://doi.org/10.1002/elps.200500948>
11. Tothova C., Nagy O., Kovac G., 2016, Serum proteins and their diagnostic utility in veterinary medicine: a review. *Veterinari Medicina*, 61: 475-496. <https://doi.org/10.17221/19/2016-VETMED>
12. Wijnen PA, van Dieijen-Visser MP. Capillary electrophoresis of serum proteins. Reproducibility, comparison with agarose gel electrophoresis and a review of the literature. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.*, 1996 Jul, 34(7):535-45. doi: 10.1515/cclm.1996.34.7.535.