

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

ՊԱՐՍԵԴՅԱՆ ԼԻԼՅԱ ՄՈՒՇԵՂԻ

ԿՈՎԿԱՍՅԱՆ ԳՅՈՒՐԶԱՅԻ ԹՈՒՅՆԻ ԵՎ ԽՆԿԱԾԱՂԿԻ ԵԹԵՐԱՅՈՒՂԻ ՀԱՄԱԿՑՎԱԾ
ՊԱՏՐԱՍՏՈՒԿԻ ՀԱԿԱՑԱՎԱՅԻՆ ԵՎ ՀԱԿԱԲՈՐԲՈՔԱՅԻՆ ԱԶԴԵՅՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆ

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

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2023

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

ПАРСЕГЯН ЛИЛЯ МУШЕГОВНА

ИССЛЕДОВАНИЕ АНАЛЬГЕТИЧЕСКОГО И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ
КОМБИНИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА ЯДА КAVKAZСКОЙ
ГЮРЗЫ И ЭФИРНОГО МАСЛА ДУШИЦЫ

АВТОРЕФЕРАТ

днсертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.09. «физиология человека и животных»

ЕРЕВАН 2023

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի գիտական խորհրդի նիստում

Գիտական ղեկավար՝

Կ.գ.թ. Ա.Վ. Ոսկանյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

Կ.գ.դ. Վ.Հ. Սարգսյան
Կ.գ.թ. Ա.Ս. Խաչունց

Առաջատար կազմակերպություն՝

Երևանի Պետական Համալսարան

Պաշտպանությունը կայանալու է 2024 թվականի հունվարի 26-ին, ժամը 13:00-ին ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտում, ֆիզիոլոգիայի 023 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0028, ք. Երևան, Օրբելի եղբ. 22)

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

Սեղմագիրն առաքված է 2023 թվականի դեկտեմբերի 25-ին

023 մասնագիտական խորհրդի
գիտական քարտուղար, Կ.գ.թ.

Ն. Է. Թադևոսյան

Тема диссертации утверждена на ученом совете Института физиологии им. Л. А. Орбели НАН РА

Научный руководитель:

к.б.н. А.В. Восканян

Официальные оппоненты:

д.б.н. В.А. Саргсян
к.б.н. А.С. Хачунц

Ведущая организация:

Ереванский Государственный Университет

Защита диссертации состоится 26 января 2024г. в 13⁰⁰ч. на заседании Специализированного совета 023 по Физиологии, в Институте физиологии 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.physiol.sci.am.

Автореферат разослан 25 декабря 2023г.

Ученый секретарь специализированного совета 023
Кандидат биологических наук

Н.Э. Тадевосян

ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ՆԿԱՐԱԳԻՐԸ

Հետազոտության արդիականությունը. Ցավը հանդիսանում է լուրջ առողջապահական հիմնախնդիր ամբողջ աշխարհում: Առողջապահության համաշխարհային կազմակերպության և Հիվանդությունների վերահսկման համաշխարհային կենտրոնի տարեկան հաշվետվությունների համաձայն աշխարհում յուրաքանչյուր 5-րդ մարդ ամեն օր զգում է սուր, իսկ յուրաքանչյուր 10-րդը՝ քրոնիկ ցավ: 2022 թվականի տվյալներով ԱՄՆ բնակչության 30 %-ը տառապում է խրոնիկ ցավից, մասնավորապես՝ հոդացավերից և մեջքի ցավից: Ցավն այն առավել հաճախ հանդիպող ախտանշանն է, որի պատճառով մարդիկ դիմում են բժշկի, ընդ որում, ըստ վիճակագրական տվյալների, այս ախտանշանի համար հավասարապես խոցելի են բոլոր տարիքային, սեռական և էթնիկ խմբերը (World Health Statistics 2022; Michaela R. et al. 2019-2021): Թեև ցավը հանդիսանում է օրգանիզմում ընթացող տարբեր պաթոլոգիկ վիճակների վերաբերյալ նախազգուշացնող ազդանշան, սակայն շատ հաճախ բուն հիվանդության բուժումից հետո էլ ցավը չի անցնում, այսինքն՝ ցավը անջատվում է իր սկզբնաղբյուրից և դառնում առանձին առողջական խնդիր հիվանդի համար: Ցավը լուրջ բացասական անդրադարձ է ունենում ոչ միայն հիվանդի առողջական վիճակի ցուցանիշների, այլ նաև հոգեկան և հոգեբանական վիճակի վրա: Եվ որպես հետևանք բերում է անաշխատունակության և սթրեսի, էապես ազդելով կյանքի որակի վրա: Ուստի, ինչքան էլ որ ցավազգայունությունը կենսական կարևոր նշանակություն ունենա կենդանիների և մարդկանց գոյատևման համար, այնուամենայնիվ երկարատև ցավազգայունությունը կամ դրա քրոնիկ բնույթը կարող է հակաարդյունավետ ազդել հիվանդի վարքագծի և հոգեհուզական վիճակի վրա:

Ներկայումս գոյություն ունեն բազմաթիվ ցավազրկող դեղամիջոցներ, որոնք լայնորեն կիրառվում են կլինիկական պրակտիկայում, սակայն դրանք ունեն մի շարք թերություններ և կողմնակի ազդեցություններ: Մասնավորապես, օպիոիդային ցավազրկողները, բացի կախվածությունից, կարող են առաջացնել նաև փորկապություն, սրտխառնոց, փսխում, մկանների կաթված, շնչահեղձություն, սրտի կանգ և այլն (McDonald J., 2005): Կլինիկական հետազոտությունների արդյունքում ապացուցված է, որ ոչ ստերոիդային հակաբորբոքային դեղամիջոցների երկար ընդունման պարագայում հիվանդների մոտ ի հայտ են գալիս աղեստամոքսային համակարգի խանգարումներ, ընդուպ մինչև ստամոքսի և տասներկու մատնյա աղիքի խոցերի առաջացում: Իսկ ստերոիդային բնույթի դեղամիջոցների ընդունումը ուղեկցվում է ինունային համակարգի և նյութափոխանակության խանգարումներով (Harirforoosh H. et al. 2013): Այդ իսկ պատճառով ողջ աշխարհում շարունակվում է արդիական մնալ առավել անվտանգ, կախվածություն չառաջացնող և արդյունավետ ցավազրկող դեղամիջոց ստեղծելուն ուղղված հետազոտությունները:

Բնական ռեսուրսները հակացավային և հակաբորբոքային դեղամիջոցների ստեղծման հիմնական նախանյութերն են: Հականոցիցեպտիկ դեղամիջոցների հնարավոր թեկնածուի որոնումները բերում են էթնոբուսական ռեսուրսների և ֆաունայի տարբեր ներկայացուցիչների թույների սկրինինգի: Օրինակ՝ կանաբինոլիդները հիմնականում ստացվում են հնդկական կանեփից, մորֆինը՝ քնաբեր կակաչից, իսկ սալիցիլաթթուն՝ ասպիրինի նախանյութը, ուռենազգիների կեղևից: Նոցիցեպտիկ և հականոցիցեպտիկ համակարգերի փոխազդեցության և դրանց վրա տարբեր էկզոգեն ցավազրկող միջոցների ազդեցության ուսումնասիրման համար վերջին ժամանակներս ակտիվորեն կիրառվում են նաև կենդանական թույներ: Հայտնի է, որ սուբլետալ չափաբաժնի կիրառման դեպքում կորբանների մի շարք տեսակների թույները ցուցաբերում են ցավազրկող ազդեցություն:

Նոր դեղամիջոցների ստեղծմանն ուղղված գիտական հետազոտություններում շատ արդիական տենդենց է նաև համակցված պատրաստուկների ստացումը, որոնք իրենց մեջ ներառում են մեկից ավելի ակտիվ բաղադրիչներ՝ միաժամանակ ապահովելով դեղի ազդեցության մի քանի մեխանիզմների զուգահեռ ակտիվացում: Բացի այդ, մի քանի ակտիվ բաղադրիչի համակցման պարագայում կարելի է նվազեցնել առանձին ակտիվ բաղադրիչների չափաբաժինները՝ դրանով իսկ կրճատելով հնարավոր կողմնակի ազդեցությունները: Ուստի, հակացավային պատրաստուկի մշակումը, որը չի պարունակի այնպիսի նյութեր, ինչպիսիք են մորֆինը կամ տետրահիդրոկանաբինոլը (մորֆինը և ֆենանտրենային խմբի այլ ալկալոիդները բերում են կախվածության առաջացման, շնչառական խնդիրների, սրտի և աղիների աշխատանքի խաթարման, իսկ կանաբինոլիդները, որոնք ազդում են CB1 ռեցեպտորների վրա, կարող են հանգեցնել ընկճվածության և հոգեկան շեղումների) չափազանց արդիական է ժամանակակից բժշկության բազմաթիվ ոլորտների համար: Խիստ արդիական է մշակել ցավազրկող դեղանյութ, որը չի ունենա արտահայտված կողմնակի ազդեցություններ օրգանիզմի նյութափոխանակային, օրգանական և մտավոր գործառույթների վրա: Այդպիսի դեղամիջոցի անհրաժեշտությունը կա սկսած ռազմական վիրաբուժությունից (վնասվածքներ, անդամահատումներ և այլն) մինչև պալիատիվ բժշկություն (քաղցկեղով հիվանդների կյանքի որակի բարելավում և այլն):

Այսպիսով, տարբեր բնույթի և ինտենսիվության ցավերի բուժման համար անհրաժեշտ են ավելի թիրախավորված ազդեցությամբ դեղամիջոցներ, որոնք կունենան արագ և տևական ցավազրկող ազդեցություն: Խիստ արդիական է առաջարկել նաև նույն բաղադրակազմով դեղամիջոցը՝ տարբեր դեղաձևերով, որոնցից յուրաքանչյուրը կունենա իր կիրառման ոլորտը և առավելությունը:

Հետազոտական աշխատանքի **նպատակն է** ստանալ օժի թույն (կորբայի և/կամ գյուրգայի) և խնկածաղկի եթերայուղ պարունակող համակցված պատրաստուկ, որն օժտված կլինի արտահայտված հակացավային և հակաբորբոքային ազդեցությամբ և ազդելով օրգանիզմի նոցիցեպտիկ համակարգի երկու տարբեր ուղիների վրա՝ կունենա առավելագույն գումարային հակացավային արդյունք:

Դրված նպատակի իրականացման համար առաջ են քաշվել հետևյալ **խնդիրները**.

1. Հետազոտել կորբաների տարբեր տեսակների և գյուրգայի ինտակտ և արգելակված ֆերմենտային ակտիվությամբ թույների հակացավային և հակաբորբոքային ազդեցությունները և իրականացնել համեմատական վերլուծություն՝ որոշելով ամենաարդյունավետ հակացավային ազդեցությամբ օժտված թույնի արդյունավետ չափաբաժինը:
2. Ստուգել ընտրված թույնի (ինտակտ և արգելակված ֆերմենտային ակտիվությամբ) տարբեր չափաբաժինների հնարավոր ցավառաջացնող ազդեցությունը:
3. Ստանալ հայկական լեռնաշխարհում վայրի աճող խնկածաղիկ սովորականի եթերայուղ և իրականացնել բաղադրակազմի որակական և քանակական հետազոտություն:
4. Հետազոտել հայկական լեռնաշխարհում վայրի աճող խնկածաղիկ սովորականի եթերայուղի տարբեր չափաբաժինների հակացավային և հակաբորբոքային ազդեցությունները և համեմատել ստանդարտ ցավազրկող դեղամիջոցների ազդեցությունների հետ:
5. Որոշել բոլոր հետազոտվող նյութերի ազդման ամենաարդյունավետ ժամանակային միջակայքերը:
6. Ընտրված թույնի և եթերայուղի ամենաարդյունավետ չափաբաժիններով պատրաստել թույն-եթերայուղ համակցված պատրաստուկ և վերջինիս հակացավային ազդեցությունը համեմատել առանձին ակտիվ բաղադրիչների հակացավային ազդեցությունների հետ:
7. Որոշել համակցված պատրաստուկի տոքսիկությունը, հնարավոր կողմնակի ազդեցությունները և պահպանման ժամկետները:
8. Որոշել համակցված պատրաստուկի ազդման հնարավոր մեխանիզմները:

Աշխատանքի նորույթը.

1. Առաջին անգամ, միևնույն փորձարարական պայմաններում համեմատվել են դասակարգման տարբեր գծերի պատկանող կորբաների թույների հակացավային ազդեցությունները:
2. Իրականացվել է գյուրգայի թույնի լայն դիապազոնի չափաբաժինների սքրինինգ՝ որոշելով թույնի ցավային ազդեցությունից դեպի հակացավային ազդեցության փոփոխությունը՝ կախված չափաբաժիններից:
3. Մշակվել և արտոնագրվել է նոր բաղադրակազմով ցավազրկող քսուք, որը ներառում է տեղական ծագման կենդանական և բուսական ակտիվ բաղադրիչներ:

Գործնական նշանակությունը. Հետազոտությունների մի մասը իրականացվել է դեղագործական կազմակերպության մասնակցությամբ, ինչը մեծացնում է հետազոտության արդյունքների կիրառական և առևտրայնացման հեռանկարները: Մշակվել է տեղական հումքից հայկական արտադրանքի նախատիպ, ինչը թույլ կտա նվազեցնել վերջնական արտադրանքի ինքնարժեքը՝ խուսափելով նյութերի ներկրման համար հնարավոր լոգիստիկ խնդիրների առաջացումից: Առաջարկվող պատրաստուկը կարող է կիրառություն ունենալ բժշկության տարբեր բնագավառներում, այդ թվում ռազմական վիրաբուժության և մեջ, այն մեծ պահանջարկ կունենա ինչպես ներքին, այնպես էլ արտասահմանյան շուկայում, քանի որ չի պարունակում կախվածություն առաջացնող միացություններ:

Հրատարակությունները. Ատենախոսական աշխատանքի հիմնական արդյունքները տպագրվել են 7 գիտական հոդվածներում՝ միջազգային գիտական պարբերականներում:

Աշխատանքի փորձարկումը.

1. Արտոնագիր № 839 Y: Հեղինակներ՝ Արմեն Ոսկանյան, Արմենուհի Մողրովյան, Աննա Դարբինյան, Լիլյա Պարսեղյան: Երկիր՝ ՀՀ: Անվանումը՝ հակաբորբոքային և ցավազրկող քսուք, սեպտեմբերի 18, 2023թ.:
2. Հաշվետու զեկույց, The driving force of science: Neuroscience, Toxicology event. մայիսի 26, 2023թ., Երևան:
3. Գիտաժողով, International Conference on Biotechnology and Health 2020. հոկտեմբեր 29–31, 2020թ., Երևան

4. Գիտաժողով, Young Scientists in Medicine and Biology. ապրիլ 18-19, 2019թ., Սոչի
5. Գիտաժողով, The European Section of the International Society of Toxinology. սեպտեմբեր 22-26, 2018թ., Երևան

Ատենախոսության կառուցվածքը: Ատենախոսական աշխատանքը շարադրված է համակարգչային շարվածքի 131 էջի վրա և կազմված է ներածությունից, գրական ակնարկից, հետազոտության արդյունքներից և դրանց քննարկումից, եզրակացություններից (8 կետ) և գրական ցանկից (172 հղում): Պարունակում է 46 գծապատկեր և նկար, 1 աղյուսակ:

ԳՐԱԿԱՆ ԱԿՆԱՐԿ

Գրական ակնարկի մեջ ներկայացված է ցավի նյարդա-ֆիզիոլոգիական և հոգեբանական ընկալումը, ցավի տեսակները, օրգանիզմի նոցիցեպտիկ և հակաՆոցիցեպտիկ համակարգերը: Ներկայացված են հակացավային ազդեցությամբ օժտված էկզոգեն ակտիվ միացությունները, այդ թվում՝ ցավազրկող դեղամիջոցները, բուսական ծագման ակտիվ միացությունները՝ որպես պոտենցիալ ցավազրկողներ և կենդանական թույների կիրառումը բժշկության մեջ՝ կովկասյան գյուրզայի և տարբեր տեսակի կոբրաների թույների ցավառաջացնող/ցավազրկող ունակությունները:

ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ

Հետազոտությունները կատարվել են ՀՀ ԳԱԱ Լ. Ա. Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի «Ֆիզիոլոգիապես ակտիվ նյութերի գտնան, սերտիֆիկացման և ստանդարտացման» լաբորատորիայում:

Փորձարարական կենդանիներ և նյութեր. Կենդանիներ. Բոլոր փորձերը իրականացվել են «Կենդանիների լաբորատոր խնամքի սկզբունքների» համաձայն՝ Եվրոպական համայնքների խորհրդի 2010 թվականի սեպտեմբերի 22-ի հրահանգին (2010/63/EU), որը հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի գիտական խորհրդի կողմից (արձանագրային ծածկագիր N4, հաստատման ամսաթիվ՝ 22.07.2021):

Յուրաքանչյուր կնդանի ենթարկվել է միայն մեկ փորձարարական միջամտության:

Հետազոտությունները իրականացվել են սեռահասուն ալբինոս առնետների (200±20գ) և մկների (20±2գ) վրա:

Հետազոտությունները իրականացվել են 66 փորձարարակն խմբերի վրա՝ յուրաքանչյուրում 6-12 կենդանի:

Հետազոտությունների ընթացքում ընդհանուր առմամբ օգտագործվել են 402 կենդանական առանձնյակներ:

Գյուրզայի թույն. ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտում կովկասյան գյուրզաների մեխանիկական կթման արդյունքում ստացված թույնը չորացվել է վակուումային չորացուցիչում՝ սիլիկագելի վրա, -0.9 մթն ճնշման պայմաններում՝ մինչև բյուրեղացում և կիրառվել հետազոտությունների ընթացքում:

Կոբրաների թույներ. Հետազոտությունների ընթացքում կիրառվել են 5 տեսակի կոբրաների թույներ (Naja naja oxiana-NNO, Naja naja pallida-NNP, Naja naja kaouthia-NNK, Naja naja nigricincta-NNN, Ophiophagus Hannah-OH), որոնք ձեռք են բերվել ֆրանսիական Լատոքսան ֆիրմայից (Latoxan, France):

Հայկական լեռնաշխարհում վայրի աճող խնկածաղիկ սովորականի եթերայուղ (OVEO). *O. vulgare* բույսը հավաքվել է ծաղկման փուլում՝ Գեղարքունիքի մարզ, գյուղ Չկալովկայի տարածքից (ծովի մակարդակից 1930մ բարձրության վրա): Բույսի նույնականացումն իրականացվել է Երևանի Պետական Բժշկական Համալսարանի Ֆարմակոգնոզիայի ամբիոնում, իսկ բույսերի նմուշները պահվել և հասանելի են Հայաստանի ԳԱԱ Բուսաբանության ինստիտուտի հերբարիումում, վաուչերի նմուշի համարն է՝ ERE 191395: Հումքի առաջնային վերամշակումն իրականացվել է հավաքագրումից անմիջապես հետո՝ օրգանական և հանքային խառնուրդների հեռացման, լվացման և չորացման տեսքով: OVEO-ն ստացվել է բուսահումքի հիդր-թորման արդյունքում օգտագործելով EO-5 «5I lab testing essential oils distiller» սարքավորումը:

Ծաղկման փուլում հավաքված և համապատասխան առաջնային մշակում անցած խնկածաղիկի հումքը (ծաղիկ, տերև, ցողուն) մանրացվում է տեղադրվում հիդրո-թորման սարքավորման տարայի մեջ (500գ յուրաքանչյուր ներբեռնումը), ապա ավելացվում է 1.5լ ջուր, սարքը հերմետիկ փակվում է և միացվում: Թորումը տևում է 3 ժամ: Ստացված եթերայուղը հավաքվում է և պահվում մուգ տարայի մեջ՝ 4°C-ում: Եթերայուղի ջրազրկումը կատարվում է նատրիումի սուլֆատի անհիդրատով:

Քիմիկատներ. λ-կարագինանը, DMSO-ն, Tween80-ը, SR144528-ը և նալոքսոնը ձեռք են բերվել Sigma-Aldrich-ից (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO): Փորձերի ընթացքում կիրառված մնացած քիմիկատները եղել են անալիտիկ մաքրության:

Ստանդարտ դեղամիջոցներ. Մորֆին («Արֆարմացիա» ՓԲԸ), նատրիումի մետամիզոլ (Անալգին, «Երևան քիմ. ֆարմ» գործարան), դիկլոֆենակ նատրիում (Դիկլոֆենակ, Հեոնֆարմ, Սերբիա, N011648/03), դիկլոֆենակ քսուլ («Բելառուսի բժշկական պատրաստուկների գործարան» ՓԲԸ, Բելառուս):

Սարքավորումներ. Եթերայուղի ստացման հիդրոթորման սարքավորում (Genyond Machinery Industrial Group Limited, China), «Տաք թիթեղ» (REX-C100, Golink, Ճապոնիա), Պլետիզմոնետր (Ptm-Xn, Milton Innovations India Pvt Ltd), ֆիզիոգրակ (Digital Polygraph-physiograph, India), pH-մետր (PHS-25CW, BIOBASE):

Ֆորմալինային թեստ. Ֆորմալինային թեստը թույլ է տալիս գնահատել սուր և բորբոքային ցավը: Կենդանիներին հետևի ծախ թաթիկից IPL ներարկվում է 0.02մլ 1-5 %-ոց ֆորմալին և անմիջապես գրանցվում է թաթիկի կծել/լիզելու վարքագիծը՝ 45 րոպենների ընթացքում: Առաջին փուլը տևում է 3-5 րոպե և կոչվում է սուր փուլ, այն կապված է ֆորմալինի ներարկման արդյունքում C-նյարդաթելերի ակտիվացման հետ: Սուր փուլին հաջորդող 10-15 րոպենների ընթացքում ցավային պատասխանը գործնականում բացակայում է, այս փուլը կոչվում է հանգստի փուլ կամ ինտերֆազը: 15-20 րոպեից սկսում է զարգանալ ցավի երկրորդ, բորբոքային փուլը, որը ձգվում է մինչև 45-րդ րոպեն: Այս փուլում մասնակցում են սերոտոնինը, հիստամինը, պրոստոգլանդինները, բրադիկինինը (Dubuisson D. and Dennis S. 1977):

Տաք թիթեղի թեստ. Տաք թիթեղի թեստը թույլ է տալիս որոշել կենդանիների ջերմադիմացկունության շեմային մեծությունը՝ գրանցելով TRPV ռեցեպտորների ներգրավվածությունը ցավագրկման մեխանիզմում (Bannon A. et al. 2007): Այս թեստի ընթացքում կենդանիները տեղափոխվում են $55\pm 2^{\circ}\text{C}$ կայուն ջերմաստիճանով մետաղական թիթեղի վրա և գրանցվում է կենդանու առաջին ցավանման վարքագիծը (ցատկ, թաթիկների լսատում, քաշում, թռչկոտում): Եթե ցավանման վարք չի դրսևորվում, ապա 30 վայրկյանի ընթացքում կենդանին պետք է հեռացնել տաք թիթեղից՝ որպեսզի վերջինիս հյուսվածքները չենթարկվեն լրացուցիչ վնասվածքների:

Կարագինանային թեստ. Կրծողների մոտ թաթեղի այտուցի գրանցման տարածված մեթոդ է, in vivo բորբոքումը գնահատելու համար՝ ի պատասխան տարբեր գրգռիչների: λ -կարագինանի 1.0 %-անոց լուծույթը (50 μl) ներարկվում է կենդանու հետևի թաթիկի մեջ (IPL): Այտուցի ծավալը չափվում է պլետիզմոնետր սարքի միջոցով՝ (Ptm-Xn, India) անմիջապես ներարկման պահին (T0), 1ժ, 2ժ, 4ժ և 24ժ անց (Tn): Սովորաբար, այտուցի առավելագույն ծավալ գրանցվում է ներարկումից 2 ժամ անց: Յուրաքանչյուր կենդանու համար ստուգիչ է հանդիսանում իր T0 արժեքը (Otterness I. et al 1988):

GC-MS հետազոտություն. Եթերայուղի քանական և որակական կազմը վերլուծվել է «Հանրապետական անասնաբուժասանիտարական և բուսասանիտարական լաբորատոր ծառայությունների կենտրոն» ՊՈԱԿ-ում: Գազային քրոմատոգրաֆիայի (GC) վերլուծությունն իրականացվել է Bruker գազային քրոմատոգրաֆով (Bruker 450-GC; Bruker Corporation, Billerica, MA), որում տեղադրված է 60 մ × 0.25 մմ × 0.25 մկմ OPTIMA-FFAP աշտարակ (Macherey-Nagel, Düren, Գերմանիա): Ջերմաստիճանը տատանվել է 40-ից մինչև 220°C, սկանավորման արագությունը 3°C/րոպե, գոլորշիի ջերմաստիճանը եղել է 220°C: Հեղիումը (5.6 մաքրություն) օգտագործվել է որպես կրող գազ՝ 1 մլ/րոպե հոսքի արագությամբ: GC-ն համալրված է եղել Hewlett-Packard 5972 սերիայի զանգվածային սպեկտրոմետրիայի (MS) դետեկտորով: MS գործառնական պարամետրերը եղել են՝ 70 էՎ իոնացման լարումը և 250°C իոնային աղբյուրի ջերմաստիճանը: GC աշտարակի ծանրաբեռնվածությունից խուսափելու համար եթերայուղը նոսրացվել է 1:50 մեթանոլում: Ստացված պիկերի նույնականացումն իրականացվել է NIST-2013 գրադարանի տվյալների հիման վրա (NIST Standard Reference Database 1A):

Տոքսիկոլոգիական հետազոտություններ. Բերենսի մեթոդով հետազոտվող լուծույթի LD₅₀-ի որոշման անհրաժեշտ է կազմել ենթափորձային կենդանիների 5 խումբ, յուրաքանչյուրում 6-ական կենդանի: Ենթափորձային կենդանիների յուրաքանչյուր հաջորդ խմբին ներարկվում է նախորդից հավասարաչափ աճող միջակայքով հաջորդ չափաբաժինը՝ 0,1մլ, IP: 24 ժամ անց գրանցվում է ողջ մնացած/սատկած կենդանիների թվաքանակը յուրաքանչյուր խմբում: Փորձի արդյունքների մշակումը կատարվել է համաձայն Բերենսի կողմից առաջարկված տրամաբանության, այն է, եթե կենդանին սատկել է պատրաստուկի ցածր չափաբաժնից, ապա կսատկեր նաև բարձր չափաբաժնից, և հակառակը, եթե պատրաստուկի բարձր կոնցենտրացիայի ներարկման դեպքում կենդանին ողջ է մնացել, ապա ցածր չափաբաժնի դեպքում ևս ողջ կմնար: Ելնելով այս տրամաբանությունից, Բերենսը առաջարկել է հաշվել պատրաստուկի ամենացածր չափաբաժնից մահացած կենդանիների թիվը՝ մինչև ամենաբարձր չափաբաժնից սատկած կենդանիները թիվը, ինչպես նաև հաշվել այն կենդանիների թիվը, որոնք ողջ են մնացել պատրաստուկի ամենամեծ չափաբաժնից մինչև ավելի քիչ չափաբաժինները (Wilbrandt W. 1952):

MLO-OVEO խառնուրդում MLO-ի ֆոսֆոլիպազային ակտիվության որակական գնահատում. Թարմ ձվի սպիտակուցից առանձնացված դեղնուցին խառնվում է ֆոսֆատային բուֆեր (pH=7.4) 1:1 հարաբերակցությամբ: Խառնուրդը լցվում է փորձանոթների մեջ, ապա ավելացվում է հետազոտվող պատրաստուկը՝ 1:2000 հարաբերակցությամբ: Ստացված խառնուրդը 30 րոպե ինկուբացվում է 38 oC ջրային բաղնիքի վրա: Այնուհետև փորձանոթները տեղափոխվում են եռացող ջրի մեջ՝ 15 րոպեով: Այնուհետև փորձանոթի պարունակությունը տեղափոխվել է առարկայակիր ապակիի վրա և թույնի ֆոսֆոլիպազային ակտիվությունը գնահատվել է ըստ դեղնուցի պնդացման: Եթե դեղնուցը չի մակարդվել, ապա թույնը պահպանել է իր ֆոսֆոլիպազային

ակտիվությունը: Մեթոդի մշակումը և համապատասխան մոդիֆիկացումը կատարվել է մեր լաբորատորիայում (Voskanyan A. et al, 2021):

Մաշկագրգռիչ թեստ. Կենդանիները բաժանվում են երկու խմբի՝ փորձարարական և ստուգիչ, յուրաքանչյուրում 6 առանձնյակ: Կենդանու մեջքի հատվածում 4սմ2 հատված մազահեռացվում է: 7 օր շարունակ, ամեն օր մազահեռացված հատվածի վրա տարածվում է հետազոտվող քսուքը (փորձարարական խումբ) կամ քսուքի բազան՝ առանց ակտիվ բաղադրիչների (ստուգիչ խումբ), ծածկվում է ստերիլ բինտի շերտով և 7-րդ օրը գրանցվում է մաշկի վիճակը (A. այտուցի բացակայություն, B. թեթև կարմրություն, C. ոչ շատ ծանր այտուց, D. չափավոր այտուցվածություն, E. խիստ այտուցվածություն) (Pashmforosh M. et al. 2018):

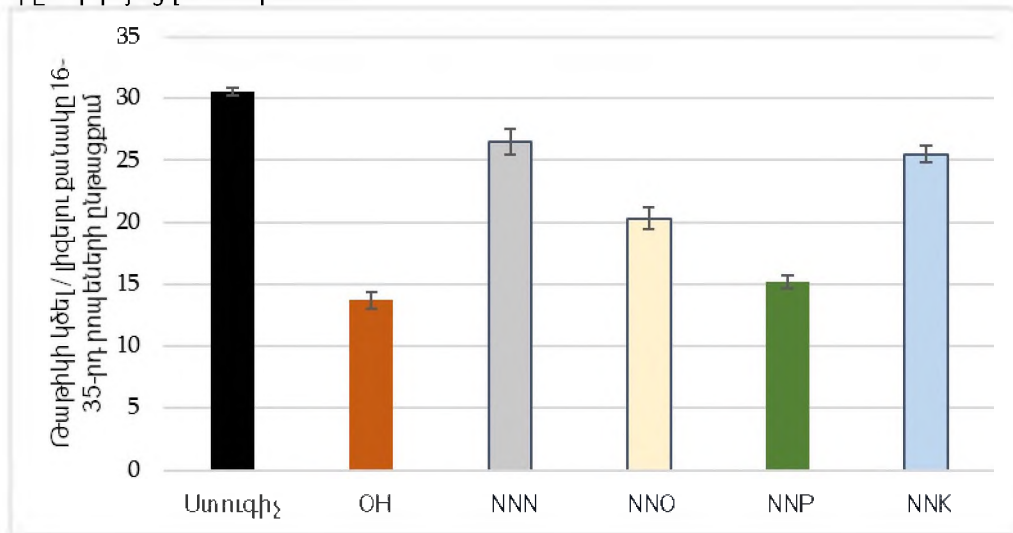
Կենդանիների ֆիզիոլոգիական պարամետրերի փոփոխության գնահատում. Ֆիզիոլոգիկ սարքավորման միջոցով գնահատվել է կենդանիների հիմնական ֆիզիոլոգիական պարամետրերի (անոթազարկ, շնչառության հաճախականություն) փոփոխությունը՝ համակցված պատրաստուկի կիրառման ֆոնին:

Բաց դաշտի թեստ. Կենդանիները մեկական (ստուգիչ և փորձարարական խմբերի) տեղափոխվել են բաց դաշտ սարքի մեջ (դաշտի տրամագիծը 63սմ, պատի բարձրությունը 32սմ) 60 րոպեով: Կենդանու շարժողական ակտիվությունը գրանցվել է ավտոմատացված ծրագրի միջոցով (Ethovision XT v5.1; Noldus Technologies):

Տվյալների վիճակագրական վերլուծություն. Ստացված տվյալները վերլուծվել են Excel 2013 և Graph Pad Prism 8.0.1 համակարգչային ծրագրերով (Graph Pad Software Inc., USA, 2018): Վիճակագրական վերլուծության համար ընտրվել է One-way ANOVA - Bonferroni Multiple Comparison թեստը: Որպես հավաստի ընդունվել են նվազագույնը $p < 0.05$ արժեքները (ns - $P < 0.05$, * - $P < 0.05$, ** - $P < 0.01$, *** - $P < 0.001$, **** - $P < 0.0001$): Տվյալները ներկայացված են որպես միջին±միջինի ստանդարտ սխալ (Mean±SEM): Graph Pad Prism 8.0.1 ծրագրով ստացված գծապատկերները ներկայացված են անգլերեն, իսկ բացատրությունները՝ հայերեն:

ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐԸ

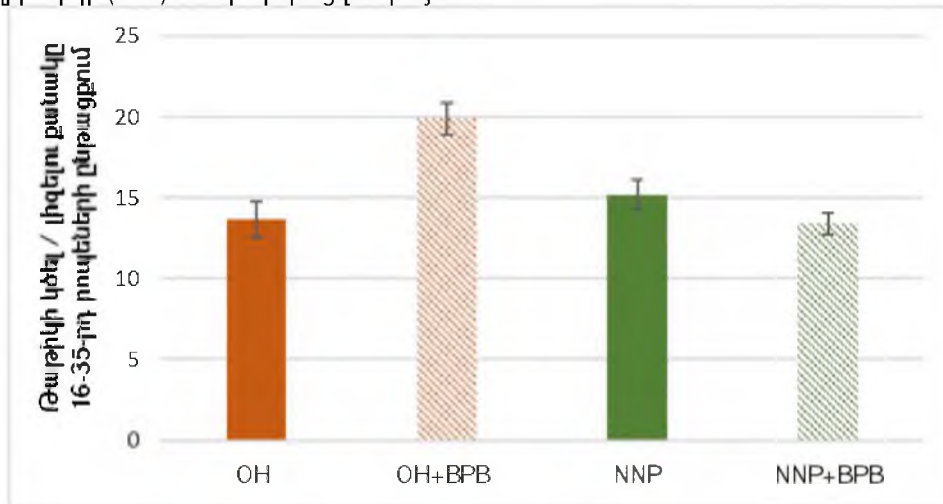
Կորբաների թոյների հակացավային ազդեցության հետազոտության արդյունքները. Մեր կողմից համեմատական հետազոտության են ենթարկվել 5 տարբեր տեսակի կորբաների (NNO, NNP, NNK, NNN, OH) թոյների հակացավային ազդեցությունները՝ ֆորմալինային թեստի միջոցով: Կենդանատեսակները ընտրվել են կորբաների գենետիկ դասակարգման տարբեր խմբերից, որպեսզի կարողանանք համեմատել դրանց ցավազրկող պոտենցիալը՝ միևնույն փորձարարական պայմաններում: Արդյունքները ներկայացված են գծ. 1-ում:



Գծապատկեր. 1. Հետազոտված 5 տեսակի կորբաների թոյների հակացավային ազդեցությունները ֆորմալինով հարուցված ցավի երկրորդ՝ բորբոքային փուլերում: Տվյալները ներկայացված են որպես Mean±SEM

Առավել բարձր ցավազրկող ազդեցություն ցուցաբերել են OH-ի և NNP-ի թոյները 55.8 % և 50.1 %, համապատասխանաբար ($P < 0.001$): Իսկ NNN-ի, NNO-ի և NNK-ի թոյները՝ 13.1 %, 16.4 % և 33.4 %, համապատասխանաբար ($P < 0.001$):

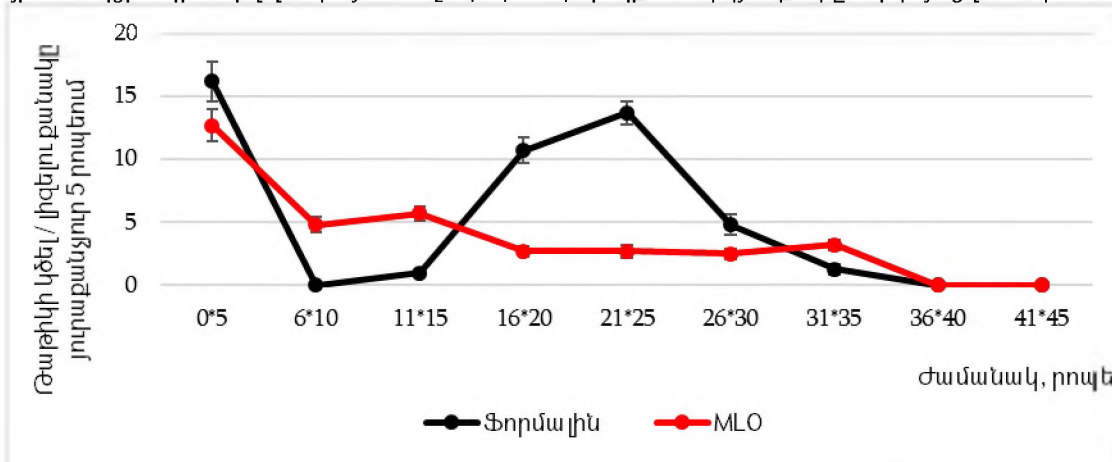
համապատասխանաբար ($P < 0.05$): Ուստի մեր հետազա հետազոտությունները շարունակվել են OH-ի և NNP-ի թայներով, որոնք կարող են դիտարկվել որպես հակացավային միջոցներ ստանալու հեռանկարային ելանյութեր: Ցավազրկման մեխանիզմում թայնի A_2 ֆոսֆոլիպազայի (PLA₂) ներգրավվածությունը հասկանալու համար իրականացրել ենք միևնույն հետազոտությունը՝ ինտակտ թայնի փոխարեն օգտագործելով բրոմֆենացիբրոմիդի (BPB) հետ ինկուբացված թայն:



Գծապատկեր 2. OH և NNP թայների ցավազրկող ազդեցությունների փոփոխությունը թայնի PLA₂-ի ինակտիվացման արդյունքում: Տվյալները ներկայացված են որպես Mean±SEM

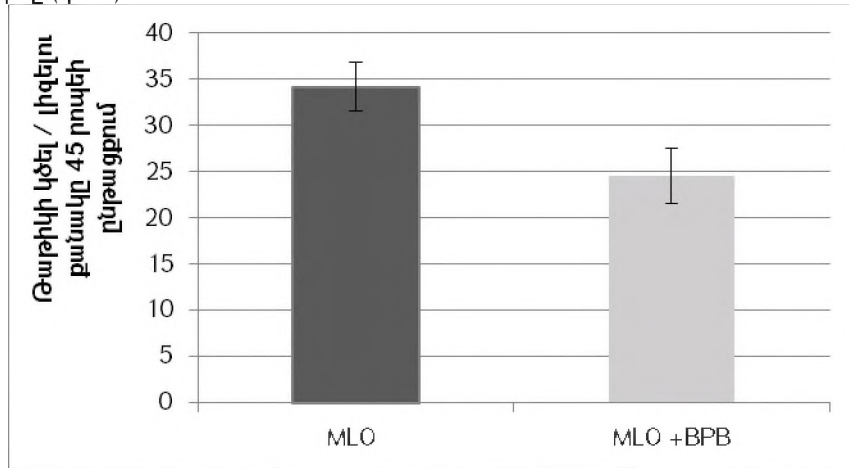
Ինչպես երևում է գծապատկերից, դիտարկվող թայների հակացավային ազդեցությունները ակնհայտորեն նվազում են PLA₂-ի արգելափակման հաշվին, ինչն էլ վկայում է ցավազրկման մեխանիզմում վերջինիս ներգրավվածության մասին ($P < 0.01$):

Կովկասյան գյուրզայի թայնի ցավային և հակացավային ազդեցությունների հետազոտում. Հայտնի է, որ օձի խայթոցը բացի զոհի օրգանիզմի վրա մի շարք պաթոլոգիական ազդեցություններ ունենալուց, առաջացնում է նաև ցավ, այտուց, հեմոռագիա: Փորձարարական կենդանիների մոտ MLO-ի թայնի միջոցով ցավ մոդելավորելու համար օգտագործել ենք տարբեր չափաբաժիններով (1, 1/5, 1/10, 1/20 և 1/30 LD₅₀) թայն: Մեր հետազոտությունների արդյունքների համաձայն MLO-ի թայնի LD₅₀-ը կազմում է IP ներարկման դեպքում կազմում է 1.8 մգ/կգ (Darbinyan A. Et al. 2018), իսկ IPL ներարկման դեպքում՝ 20 մգ/կգ (Hovhannisyan M. et al. 2015) MLO: Ենթափորձային կենդանիների յուրաքանչյուր խմբի IPL ներարկվել է թայնի համապատասխան չափաբաժինից 0.02 մլ և անմիջապես գրանցվել է թայնի կծել/լիզելու վարքագիծը՝ 45 րոպե անընդմեջ: Ցավային ռեակցիա դրսևորվել է միայն LD₅₀ չափաբաժնի դեպքում: Արդյունքները ներկայացված է գծ. 3-ում:



Գծապատկեր 3. LD₅₀ MLO-ի միջոցով մոդելավորված ցավային վարքագիծը՝ ֆորմալինի հետ համեմատած: Տվյալները ներկայացված են որպես Mean±SEM

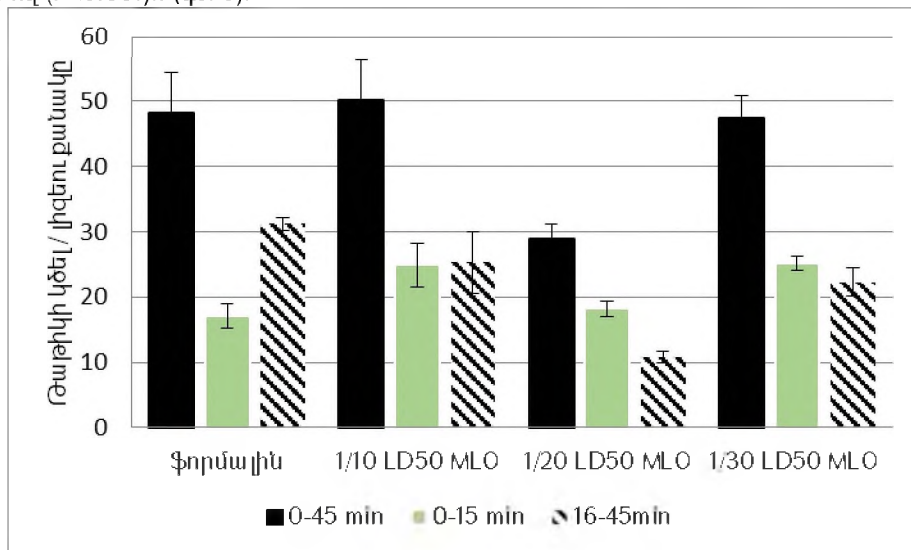
MLO-միջնորդավորված ցավառաջացման մեջ PLA₂-ի դերը հասկանալու համար կատարել ենք թույնի ինկուբացում BPB-ի հետ (1:10 հարաբերակցությամբ, 1ժ սենյակային պայմաններում) և կրկնել վերը նկարագրված փորձը (զձ. 4):



Գծապատկեր 4. MLO-ի ցավային ազդեցության փոփոխությունը թույնի PLA₂-ի ինակտիվացումից հետո: Տվյալները ներկայացված են որպես Mean ± SEM

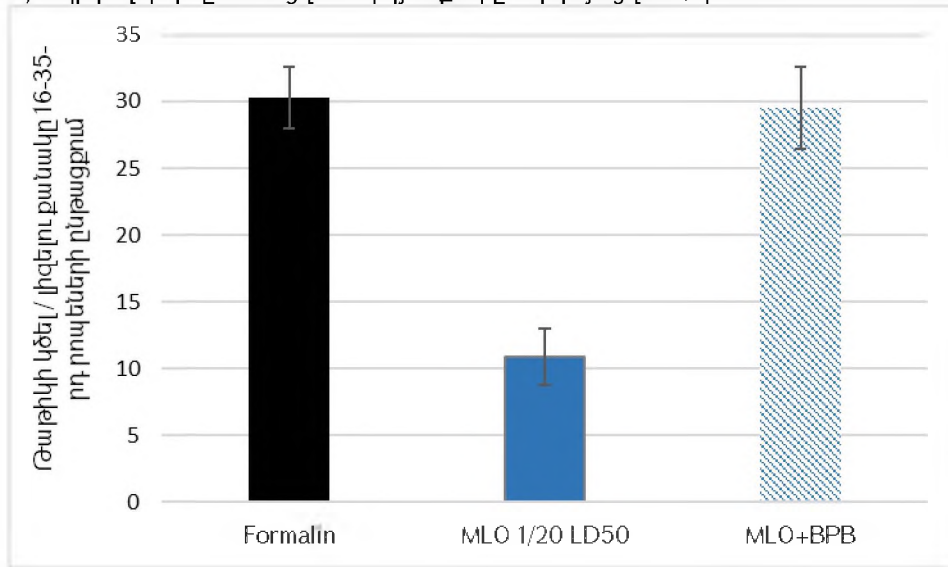
Ինչպես երևում է գծապատկերից, թույնի ցավ առաջացնելու ունակությունը ֆոսֆոլիպազային ակտիվության ճնշման հաշվին նվազել է 28.6 %-ով ($P < 0.05$):

Սակայն, ինչպես հայտնի է գրականությունից և մեր նախորդ տարիների հետազոտություններից (Moghrovyan A. et al. 2021), թույնը ցածր չափաբաժինների դեպքում բերում է ցավազրկման: Մեր կողմից իրականացվել է ընտրված չափաբաժիններով (1/5, 1/10, 1/20, 1/30 LD₅₀) թույնի հակացավային ազդեցությունների հետազոտություն: Յուրաքանչյուր խմբի ենթափորձային կենդանիներին IP ներարկվել է 0.1մլ համապատասխան չափաբաժնով թույնի լուծույթ, 15 րոպե անց IPL ներարկվել է 0.02մլ 5.0 % ֆորմալին և գրանցվել է թաթիկի կծել / լիզելու քանակը 45 րոպեի ընթացքում: Ամենաարդյունավետ ցավազրկում դրսևորվում է 1/20 LD₅₀ չափաբաժնի դեպքում, որը ցավի զարգացման 45 րոպեների ընթացքում բերում է ցավազրկման՝ 39.9 %-ով, իսկ երկրորդ փուլում՝ 64.1 %-ով ($P < 0.001$): (զձ. 5):



Գծապատկեր 5. MLO- հակացավային ազդեցությունը՝ ըստ չափաբաժինների և ըստ ցավի զարգացման փուլերի: Տվյալները ներկայացված են որպես Mean ± SEM

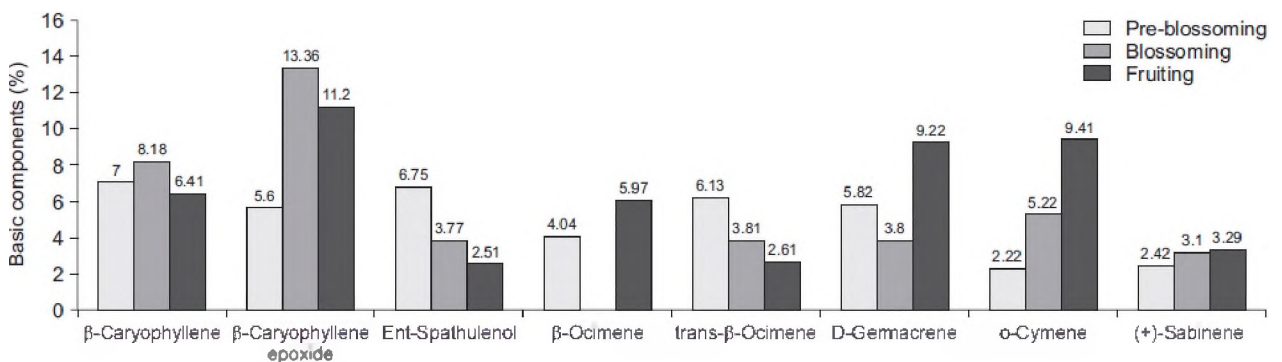
MLO-ի հակացավային ազդեցության մեջ PLA₂-ի ֆերմենտատիվ ակտիվության ներգրավվածությունը դիտարկելու նպատակով կատարել ենք թույնի ինկուբացում BPB-ի հետ (1:10 հարաբերակցությամբ, 1ժ սենյակային պայմաններում) և կրկնել փորձը: Ստացված արդյունքները ներկայացված է զձ. 6-ում:



Գծապատկեր 6. Ֆորմալինով հարուցված բորբոքային ցավի դեմ ինտակտ MLO-ի թույնի և BPB-ով ինկուբացված MLO-ի թույնի ազդեցությունների համեմատությունը: Տվյալները ներկայացված են որպես Mean±SEM

Ինչպես երևում է գծապատկերներից, PLA₂-ի արգելափակումից հետո թույնի ցավազրկող ազդեցությունը նվազում է ավելի քան 60 %-ով ($P < 0.001$): Ինչն էլ վկայում է ցավազրկման մեխանիզմում PLA₂-ի ներգրավվածության մասին:

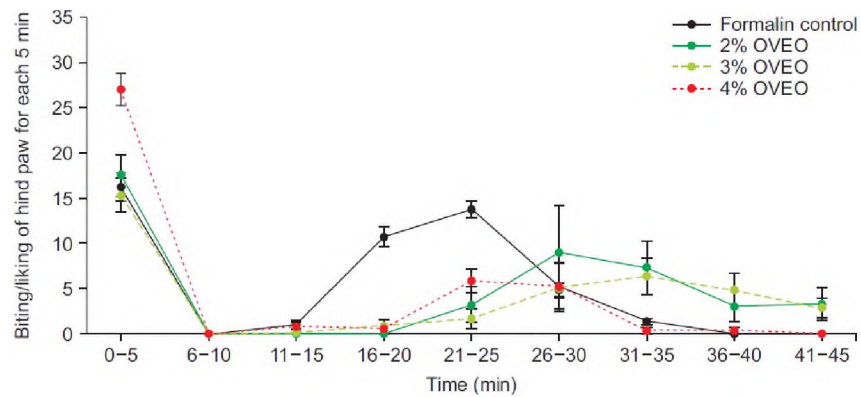
OVEO-ի որակական և քանակական կազմի հետազոտություն GC-MS մեթոդով. Հետազոտությունները ցյց են տվել, որ եթերայուղում բաղադրիչների որակական և քանակական կազմը բավականին փոփոխական է՝ աճի տարբեր փուլերում: Հիմնական բաղադրիչների քանակական փոփոխությունը (5.0 %-ից ավելի պարունակությամբ) վեգետացիոն երեք փուլերի համար ամփոփված են զձ. 7-ում:



Գծապատկեր 7. Տարբեր վեգետացիոն ժամանակահատվածներում OVEO-ի դոմինանտ բաղադրակազմը

β-կարիոֆիլենի և β-կարիոֆիլեն էպօքսիդի առավելագույն քանակները առկա են OVEO-ում՝ ծաղկման շրջանում: Հետևաբար, այս շրջանում հավաքված բույսից ստացված OVEO-ն ընտրվել է հետագա հետազոտությունների համար:

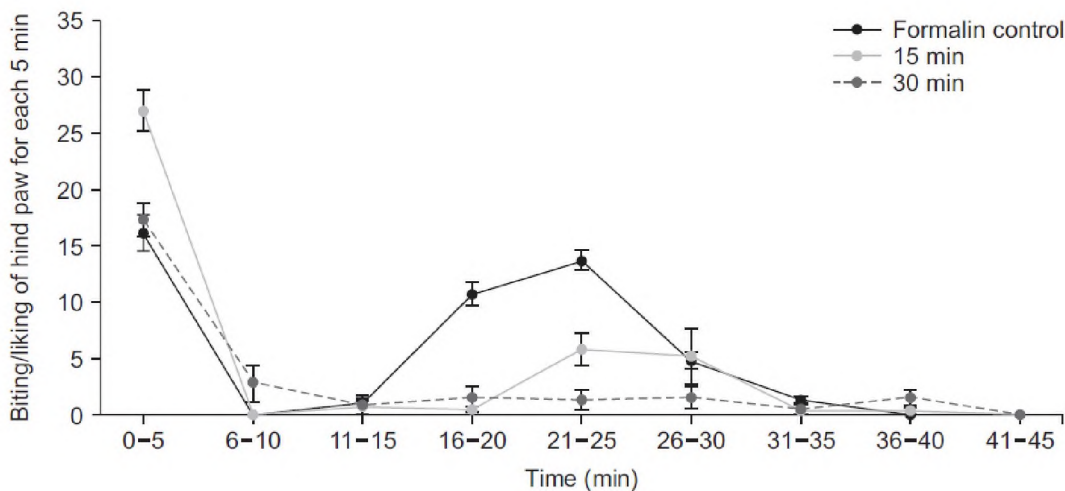
OVEO-ի հակացավային և հակաբորբոքային ազդեցության որոշում. OVEO-ի հակացավային և հակաբորբոքային ազդեցության գնահատման համար ֆորմալինային թեստի միջոցով ստուգել ենք տարբեր չափաբաժինների (2.0 %, 3.0 %, 4.0 %, 5.0 %) արդյունավետությունը:



Գծապատկեր 8. OVEO-ի տարբեր չափաբաժինների ցավազրկող ազդեցությունների համեմատական գնահատում: Տվյալները ներկայացված են որպես Mean±SEM

Ինչպես երևում է տվյալներից, ամենաբարձր ցավազրկում գրանցվում է 4.0 % (3.5 մգ/մուկ (Moghrovyan A. et al. 2021) չափաբաժնի դեպքում:

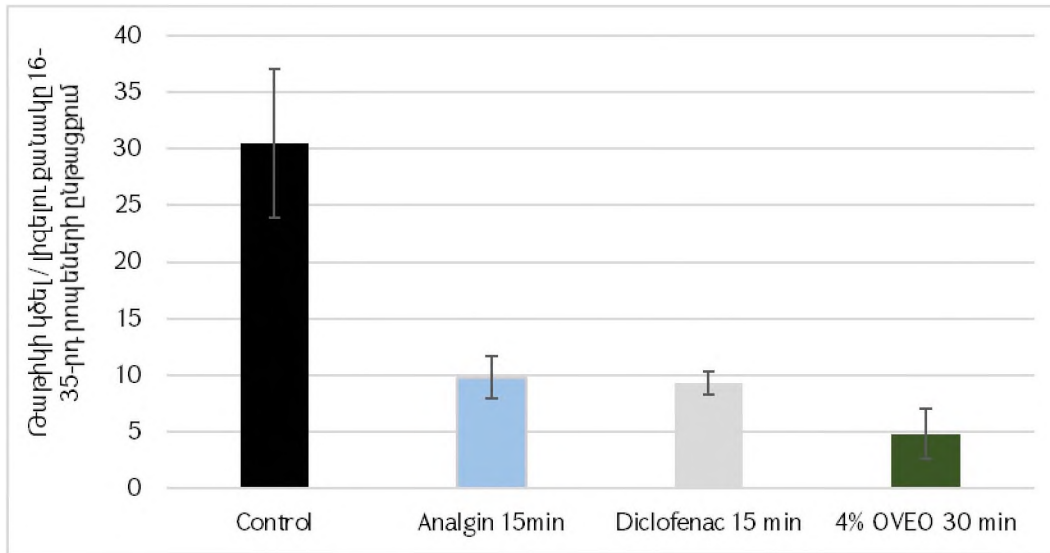
Քանի որ եթերայուղը ճարպալույծ միացություն է, որի ներծծման համար ավելի երկար ժամանակ է հարկավոր, ուստի 4.0 %-ոց եթերայուղի ցավազրկող ազդեցությունը գնահատվել է նաև տարբեր ժամանակային ինտերվալներում (ֆորմալինի ներարկումից 15 րոպե, 30 րոպե և 45 րոպե առաջ ներարկման դեպքում) (գծ. 9):



Գծապատկեր 9. 4.0 % OVEO-ի անալգետիկ ազդեցությունը ֆորմալինի ներարկումից 15 և 30 րոպե առաջ: Տվյալները ներկայացված են որպես Mean±SEM

Ինչպես երևում է գծապատկերից, հայկական լեռնաշխարհում վայրի աճող խնկածաղիկ սովորականի եթերայուղի ամենաարդյունավետ ցավազրկող չափաբաժինը 4.0 %-ն է՝ ֆորմալինի ներարկումից 30 րոպե առաջ ներարկելու դեպքում:

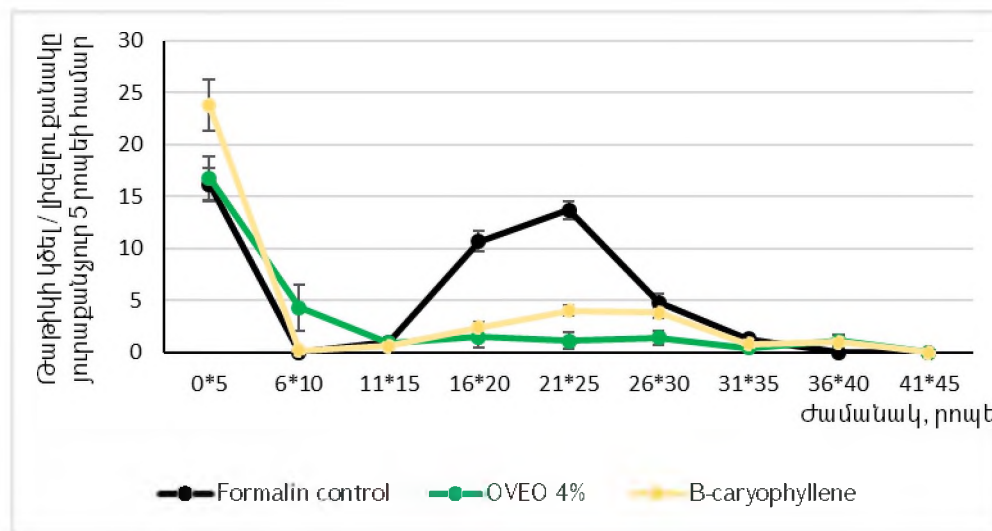
4.0 % OVEO-ի ցավազրկող ազդեցությունը համեմատվել է ստանդարտ ցավազրկողների ազդեցությունների հետ:



Գծապատկեր 10. 4.0 % OVEO-ի և ստանդարտ ցավազրկողների ազդեցությունների համեմատումը ֆորմալինային ցավի երկրորդ փուլում: Տվյալները ներկայացված են որպես Mean±SEM

Ինչպես երևում է գծապատկերից, 4.0 % OVEO-ն երկրորդ փուլում ցուցաբերում է 84.3 % ցավազրկում, այնինչ անալգինը նույն փուլում ցավազրկում է 67.9 %-ով, իսկ դիկլոֆենակը՝ 69.5 %-ով ($P < 0.001$):

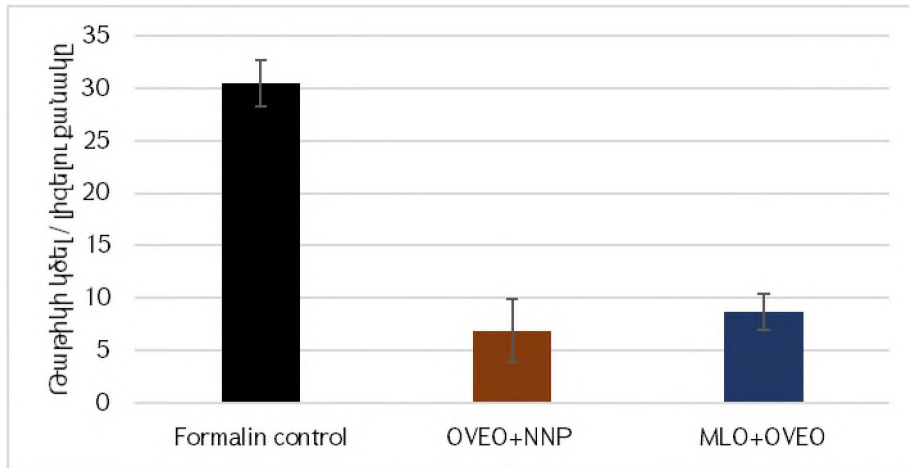
Քանի որ OVEO-ի հակացավային և հակաբորբոքային ազդեցությունը հիմնականում պայմանավորված է β -կարիոֆիլենի առկայությամբ՝ ինչը հանդիսանում է էնդոկանաբինոիդայի համակարգի CB2 ռեցեպտորների ընտրողական ագոնիստ, ուստի համեմատել ենք նաև մաքուր β -կարիոֆիլենի ցավազրկող ազդեցությունը 4.0 % OVEO-ի ազդեցության հետ:



Գծապատկեր 11. Մաքուր β -կարիոֆիլենի և 4.0 % OVEO-ի ցավազրկող ազդեցությունների համեմատում: Տվյալները ներկայացված են որպես Mean±SEM

Տվյալները ցույց են տալիս, որ OVEO-ի ցավազրկող ազդեցությունը ավելի բարձր է, քան մաքուր β -կարիոֆիլենի ցավազրկող ազդեցությունը, ինչն էլ թույլ է տալիս եզրակացնել, որ եթերայուղի ցավազրկող ազդեցությունը պայմանավորված չէ միայն առանձին β -կարիոֆիլենի ազդեցությամբ, այլ համարվում է եթերայուղի ընդհանուր քիմիական կազմի գումարային ազդեցության արդյունք:

Հայկական լերնաշխարհում վայրի աճող խնկածաղիկ սովորականի եթերայուղի և օձի թույնի համակցված պատրաստուկի հակացավային և հակաբորբոքային ազդեցությունների հետազոտում. Գծապատկեր 12-ում ներկայացված է OVEO-MLO և OVEO-NNP համակցված պատրաստուկների հակացավային ազդեցությունների համեմատական վերլուծությունը ֆորմալինային թեստի երկրորդ փուլում:



Գծապատկեր 12. OVEO-MLO և OVEO-NNP համակցված պատրաստուկների հակացավային ազդեցությունների համեմատում: Տվյալները ներկայացված են որպես Mean±SEM

Ինչպես երևում է գծապատկերից, երկու դեպքում էլ պատրաստուկների ցավազրկող ազդեցությունները շատ մոտ են, սակայն NNP դեպքում հավաստիությունը շատ ավելի փոքր է: Բացի այդ, հաշվի առնելով, որ գյուրգայի թույնը ունի տեղական ծագում, ուստի հետագա հետազոտությունները շարունակվել են OVEO-MLO պատրաստուկով:

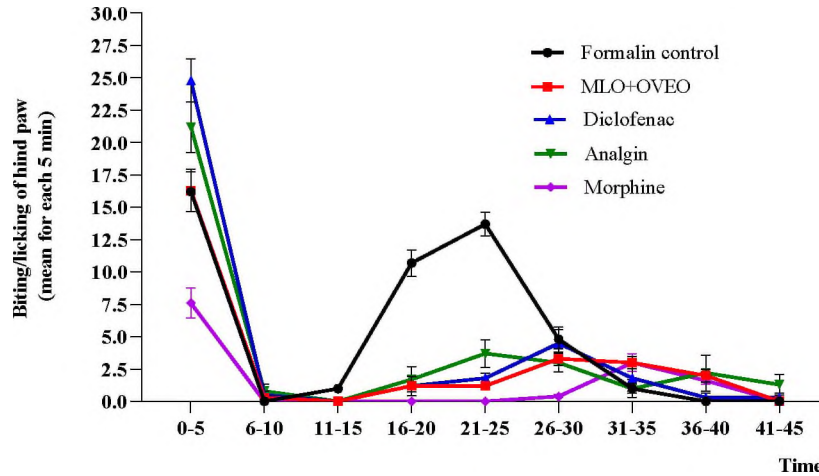


Ստուգելու համար, որ OVEO-MLO պատրաստուկի մեջ OVEO-ն չի ազդում MLO-ի ֆոսֆոլիպազային ակտիվության վրա, իրականացվել է թույնի ֆոսֆոլիպազային ակտիվության գնահատման էքսպրես թեստ:

Գծապատկեր 13. MLO-OVEO խառնուրդում թույնի ֆոսֆոլիպազային ակտիվության գնահատումը

Ինչպես երևում է նկարից, II, IV և V խմբերում դեղնուցը չի մակարդվել, ուստի թույնը պահպանել է իր ֆոսֆոլիպազային ակտիվությունը:

Համակցված պատրաստուկի ցավազրկող ազդեցությունը համեմատվել է ստանդարտ ցավազրկողների ազդեցության հետ (զծ. 14):

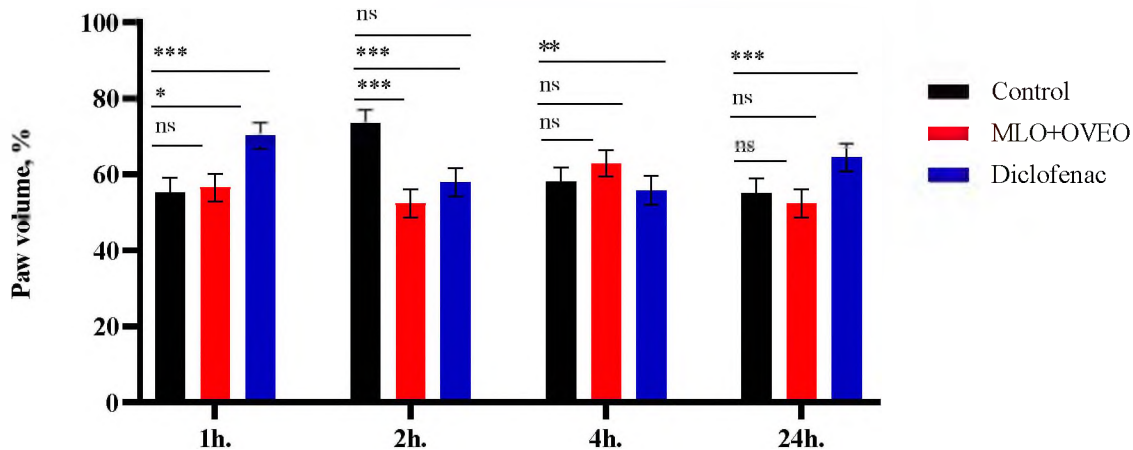


Գծապատկեր 14. OVEO-MLO-ի հակացավային ազդեցության համեմատումը ստանդարտ ցավազրկողների հետ: Տվյալները ներկայացված են որպես Mean±SEM

Այսպիսով, հետազոտության արդյունքները ցույց են տվել, որ մեր կողմից մշակված պատրաստուկը 71.5 %-ով նվազեցնում է ֆորմալինային ցավը և իր հակացավային ազդեցությամբ գերազանցում է հայտնի ցավազրկողներին:

հետազոտությունների հաջորդ փուլում գնահատվել է OVEO-MLO պատրաստուկի ազդեցությունը բորբոքային այտուցի ծավալի փոփոխության վրա՝ կարագինանային թեստի միջոցով:

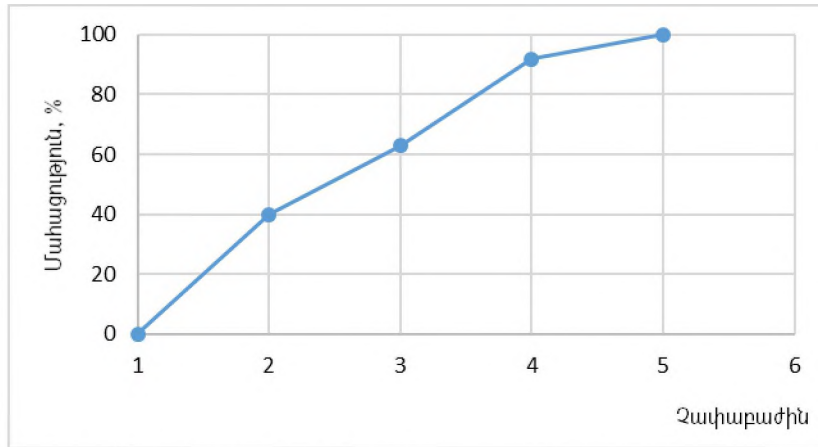
Բորբոքային այտուցի չափերի փոփոխությունը զրանցվել է ներարկումից 1ժ, 2ժ, 4ժ, 24ժ անց՝ պլետիզմոմետր սարքի օգնությամբ: Արդյունքները ներկայացված են զծ. 15-ում:



Գծապատկեր 15. Կարագինանով ինդուցված բորբոքային այտուցի ծավալի փոփոխությունը OVEO-MLO -ի ազդեցությամբ: Տվյալները ներկայացված են որպես Mean±SEM

Հետազոտության արդյունքներից երևում է, որ OVEO-MLO-ն այտուցի ձևավորման երկրորդ ժամվա ընթացքում մոտ 29 %-ով կրճատել է այտուցի ծավալը, այն դեպքում, երբ դիկլոֆենակը այտուցի ծավալը կրճատել է 21.0 %-ով:

Համակցված պատրաստուկի LD₅₀-ի որոշման նպատակով իրականացվել է տոքսիկոլոգիական հետազոտություն (զծ.16):



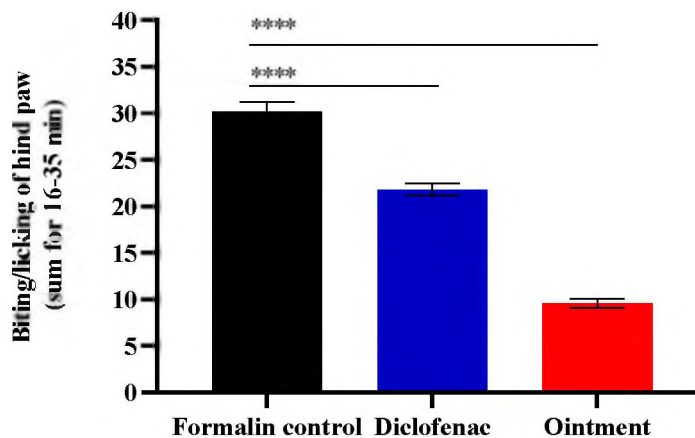
Գծապատկեր 16. OVEO-MLO համակցված պատրաստուկի տոքսիկության որոշում

Բերենսի մեթոդով հաշվել ենք հետազոտվող պատրաստուկի LD₅₀-ը, որը կազմել է 2.4 մգ/կգ: Այսինքն, թերապևտիկ չափաբաժինը կրկնակի ավելացնելու դեպքում ունենում ենք մոտ 40 % մահացություն: Ուստի հետագա հետազոտությունները նպատակահարմար ենք համարել շարունակել OVEO-MLO համակցված պատրաստուկի քսուք տարբերակով:

Համակցված պատրաստուկի քսուք տարբերակի հակացավային և հակաբորբոքային ազդեցության հետազոտություն. Համակցված պատրաստուկի քսուք տարբերակի պատրաստման համար համագործակցել ենք «Էսկո Ֆարմ» դեղագործական ընկերության հետ՝ քսուքի հիմքի պատրաստման համար անհրաժեշտ սերտիֆիկացված նյութեր ձեռք բերելու և դեղագետ-տեխնոլոգների խորհրդատվության համար:

Քսուքը ունեցել է հետևյալ բաղադրությունը. լանոլին, եղևինի յուղ, քափուր, խնկածաղկի եթերայուղ (8.0 %) և գյուրգայի թույն (1/10 LD₅₀): Քսուքի բաղադրակազմի և պատրաստման ընթացքի վերաբերյալ առկա է հեղինակային իրավունք (Արտոնագիր № 839):

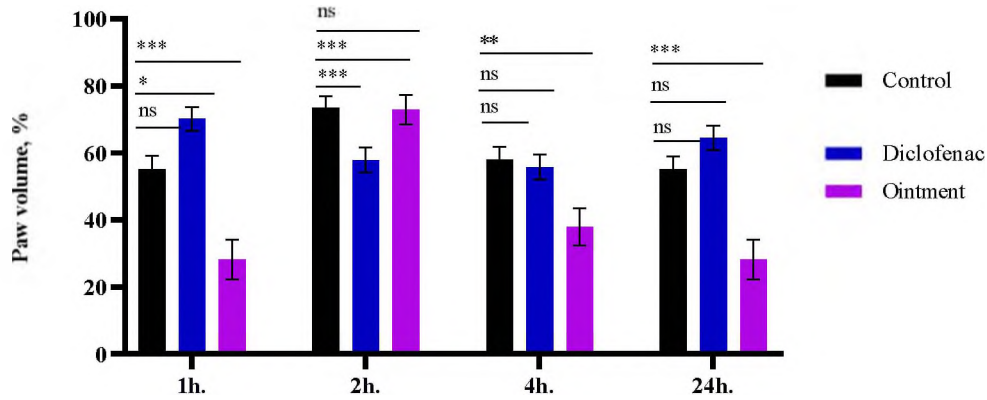
Քսուքի հակացավային ազդեցությունը հետազոտվել է ֆորմալինային թեստի միջոցով:



Գծապատկեր 17. Քսուքի հակացավային ազդեցությունը ֆորմալինային թեստի երկրորդ փուլում և համեմատումը ստանդարտ ցավազրկող քսուքի ազդեցության հետ: Տվյալները ներկայացված են որպես Mean±SEM

Գծապատկերից երևում է, որ մեր կողմից մշակված քսուքը ունի արտահայտված հակացավային և նշանակալի հակաբորբոքային ազդեցություն: Ֆորմալինային թեստի երկրորդ փուլում քսուքը դրսևորում է 68.2 % ցավազրկող ազդեցություն, այն դեպքում, երբ միևնույն պայմաններում դիկլոֆենակի քսուքը ցավազրկում է ընդհանրապես 27.8 %-ով:

Քսուքի կողմից բորբոքային այտուցի ծավալի փոփոխությունը գնահատվել է կարագինանային թեստի միջոցով: Արդյունքները համեմատվել են ստանդարտ ցավազրկող դիկլոֆենակի քսուքի ազդեցության հետ (գծ. 18):

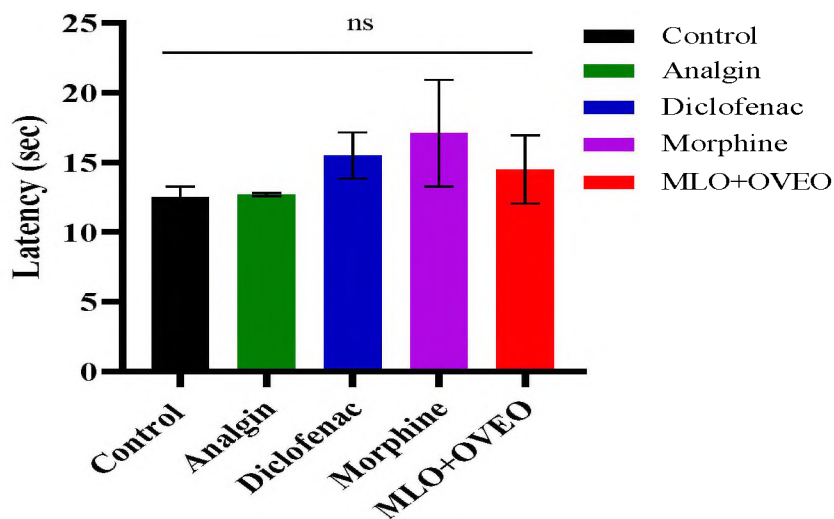


Գծապատկեր 18. Կարագինանով ինդուցված բորբոքային այտուցի ծավալի փոփոխությունը քսուքի և ստանդարտ դեղամիջոցի ազդեցությամբ: Տվյալները ներկայացված են Mean±SEM

Ինչպես երևում է գծապատկերից, քսուքը ցուցաբերել է արդյունավետ հակաբորբոքային ազդեցություն՝ կարագինանի ներարկումից 1ժ, 4ժ և 24ժ հետո, բորբոքային այտուցի ծավալը նվազեցնելով համապատասխանաբար 49.0 %, 35.0 % և 48.0 %-ով: Այն դեպքում, երբ ստանդարտ դեղամիջոցը հակաբորբոքային ազդեցություն ցուցաբերել է միայն կարագինանի ներարկումից երկու ժամ հետո՝ 29.0 %-ով: Բացի այդ, ինչպես երևում է հետազոտության արդյունքներից, դիկլոֆենակի ֆոնին այտուցի ծավալը ներարկումից 1 և 24 ժամ անց հավաստիորեն ավելի մեծ է եղել, քան ստուգիչ խմբում:

Քսուքի ազդման հավանական մեխանիզմների հետազոտում. Համակցված պատրաստուկի ազդեցության հավանական մեխանիզմների բացահայտման համար հետազոտվել են մի շարք ռեցեպտորների ներգրավվածությունը ցավազրկման մեխանիզմում:

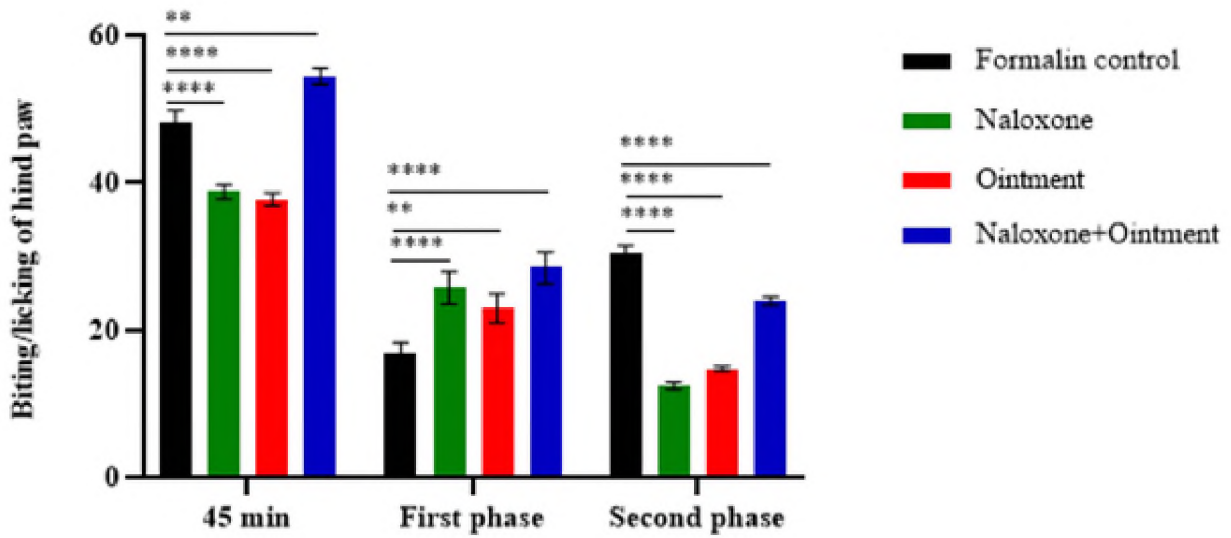
Ջերմակարգավորիչ ռեցեպտորների ներգրավվածությունը ուսումնասիրվել է տաք թիթեղ թեստի միջոցով: Ենթափորձային կենդանիները բաժանվել են 5 խմբի՝ յուրաքանչյուրում 6 կենդանի: Յուրաքանչյուր խմբի կենդանիներին IP ներարկվել է 0.1 մլ հետազոտվող լուծույթ (անալգին, դիկլոֆենակ, մորֆին, MLO-OVEO պատրաստուկ): Ստուգիչ խմբի կենդանիներին IP ներարկվել է 0.1 մլ ֆիզիոլոգիական լուծույթ: Այնուհետև կենդանիները տեղափոխվել են 55°C կայուն ջերաստիճանով տաք թիթեղի վրա և գրանցվել է առաջին ցավանման վարքագիծը (ցատկել, թաթիկի կծել / լիզել): Հետազոտության արդյունքները ներկայացված են գծ. 19-ում:



Գծապատկեր 19. Համակցված պատրաստուկի և ստանդարտ ցավազրկողների ազդեցությունը մկների վրա՝ տաք թիթեղ թեստի արդյունքում: Տվյալները ներկայացված են որպես Mean±SEM

Հետազոտության արդյունքները ցույց են տվել, որ ինչպես մեր կողմից մշակված պատրաստուկը, այնպես էլ օգտագործված բոլոր ստանդարտ ցավազրկողները չեն ազդում ($P < 0.05$) TRPV1 ռեցեպտորների միջոցով:

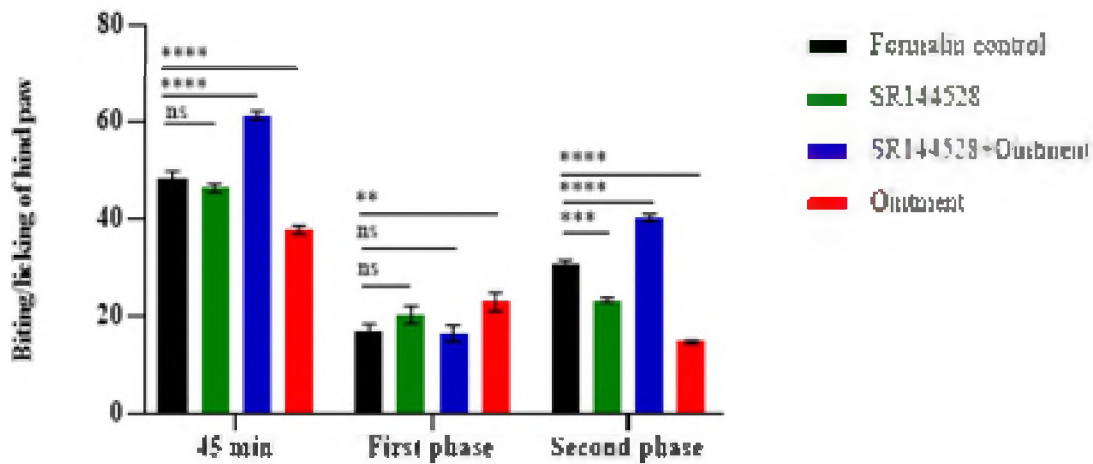
Օպիատային ռեցեպտորների ներգրավվածությունը բացահայտելու համար կիրառվել է նալոքսոն: Այն ներարկվել է 20 մկ/թաթիկ չափաբաժնով՝ IPL: Մինչև ներարկումը 40 մգ քսուքը մերսման միջոցով տարածվել է կենդանու հետևի ձախ թաթիկի վրա: 30 րոպե անց IPL ներարկվել է 0.02մլ 5.0 % ֆորմալին՝ նույն թաթիկի մեջ, և գրանցվել ցավային վարքագիծը 45 րոպեի ընթացքում (գծ. 20):



Գծապատկեր 20. Նալոքսոնի ներարկումից հետո քսուքի հակացավային ազդեցությունը ըստ ֆորմալինային թեստի առանձին փուլերի: Տվյալները ներկայացված են որպես Mean±SEM

Փորձը ցույց է տվել, որ նալոքսոնի ներարկումը ճնշել է քսուքի հակացավային ազդեցությունը ինչպես առաջին (24.0 %) այնպես էլ երկրորդ (64.0 %) փուլերում ($P < 0.0001$):

Կանաբինոիդային ռեցեպտորների ներգրավվածությունը բացահայտելու համար կիրառվել է CB2 ռեցեպտորների ընտրողական անտագոնիստ SR144528: SR144528-ի ներարկումից (1 մկ/կգ, IPL) առաջ կենդանու թաթիկին քսվել է 40 մգ քսուք, իսկ 30 րոպե անց նույն թաթիկի մեջ IPL ներարկվել է 0.02մլ 5.0 % ֆորմալին և գրանցվել ցավային վարքագիծը 45 րոպեի ընթացքում (գծ. 21):



Գծապատկեր 21. SR144528-ի ներարկումից հետո քսուքի հակացավային ազդեցությունը ըստ ֆորմալինային թեստի առանձին փուլերի: Տվյալները ներկայացված են որպես Mean±SEM

Ինչպես երևում է գծապատկերից, SR144528-ի ներարկումը ճնշել է քսուքի հակացավային ազդեցությունը ինչպես առաջին (71.0 %) այնպես էլ երկրորդ (73.0 %) փուլերում ($P < 0.0001$): Այսպիսով, քսուքի կողմից ցավազրկման մեխանիզմում ներգրավված են օպիատային և կանաբինոիդային ռեցեպտորները, իսկ ջերմակարգավորիչ ռեցեպտորները որևէ դերակատարում չունեն:

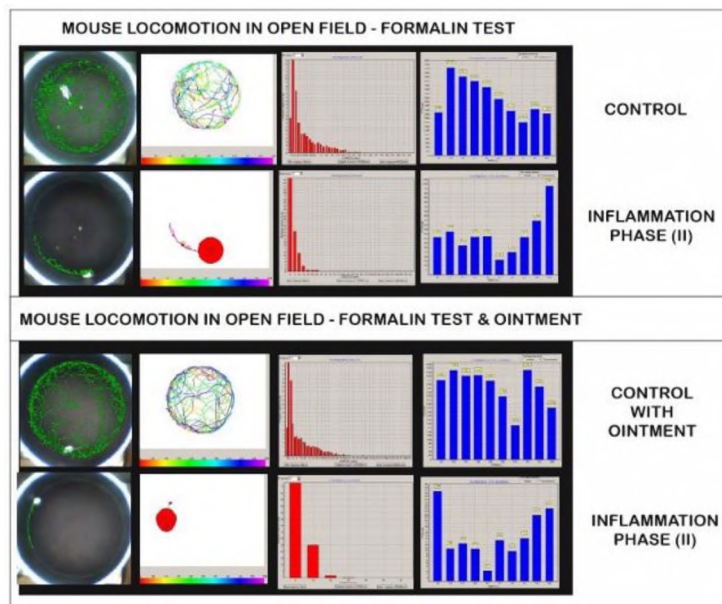
Քսուքի հնարավոր կողմնակի ազդեցությունների հետազոտում. Քսուքի հնարավոր մաշկազրգոյիչ կամ ալերգիկ ազդեցությունները հետազոտվել են մաշկազրգոյիչ թեստի միջոցով: Իրականացվել է ենթափորձային կենդանիների (ստուգիչ և փորձարարական) մեջքի 4սմ² հատվածի մազահեռացում (“Veet”, Reckitt and Benckizer, Ֆրանսիա, օգտագործման ցուցումներին համապատասխան): Հաջորդ օրը և 7 օր շարունակ կենդանիների մեջքի մազահեռացված հատվածներին փորձարարական խմբում տարածվել է 40 մգ քսուք, իսկ ստուգիչ խմբում՝ նույն քանակի քսուքի հիմք: Այնուհետև, քսուքի ներծծումից հետո, այդ հատվածները ծածկվել են բամբակով: Յուրաքանչյուր օր մաշկի տեսքը լուսնկարվել է և յոթերորդ օրը գնահատվել է մաշկի կարմրածությունը / գրգռվածությունը: Գծապատկեր 22-ում ներկայացված է փորձարարական խմբի մեկ կենդանու մաշկի տեսքը առաջին և յոթերորդ օրերին:



Գծապատկեր 22. Կենդանու մաշկի տեսքը քսուքի տարածման առաջին օրը՝ ձախից, և մեկ շաբաթ անց՝ աջից:

Մաշկագրգռիչ թեստի միջոցով ցույց է տրվել, որ մեկ շաբաթ անընդմեջ քսուքի տարածումը առանց մազաձածկույթի մաշկի վրա ոչ մի տեսակ կողմնակի ազդեցություն չի առաջացնում՝ նույնիսկ թեթև կարմրություն:

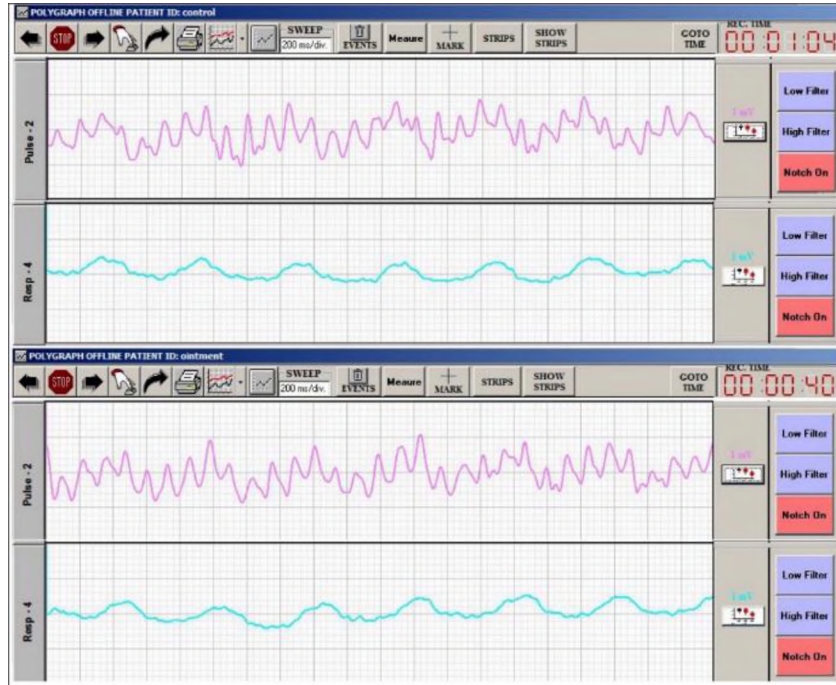
Բաց դաշտի թեստի միջոցով գնահատվել է քսուքի հնարավոր ազդեցությունը կենդանու շարժողական ակտիվության վրա: Ստուգիչ (կենդանու հետևի ձախ թաթիկին քսվել է 40 մգ քսուքի հիմք և ներարկվել 0.02 մլ ֆորմալին) և փորձարարական (կենդանու հետևի ձախ թաթիկին քսվել է 40 մգ քսուք և ներարկվել 0.02մլ ֆորմալին) խմբի կենդանիները հերթով տեղափոխվել են «բաց դաշտ» և իրականացվել է տեսաձայնագրում: Ստացված տվյալները ենթարկվել են համակարգչային վերլուծության (գծ. 23):



Գծապատկեր 23. Կենդանու շարժման գրանցումը բաց դաշտում

Հետազոտության արդյունքները ցույց են տվել, որ քսուքը որևէ նշանակալի ազդեցություն չունի կենդանու շարժողական ակտիվության վրա:

Ֆիզիոգրաֆ սարքավորման միջոցով գնահատվել է կենդանու մոտ ֆիզիոլոգիական պարամետրերի (անոթազարկ, շնչառության հաճախականություն) դինամիկ փոփոխությունները: Ենթափորձային երկու խմբի առնետները քննցվել են նեմբուտալով (40 մգ/կգ չափաբաշժնով): Ստուգիչ խմբի կենդանիների պոչին տարածվել է քսուքի հիմք և կատարվել գրանցում՝ ըստ արտադրողի ցուցումների: Փորձարարական խմբում առնետների պոչին քսուք և կատարվել գրանցում՝ ըստ արտադրողի ցուցումների (գծ. 24):



Գծապատկեր 24. Կենդանիների անոթազարկի և շնչառության հաճախականության գրանցումը ստուգիչ խմբում և քսուքի կիրառումից հետո

Հետազոտության արդյունքների համաձայն՝ քսուքը որևէ նշանակալի ազդեցություն չի ունենում հետազոտված ֆիզիոլոգիական ցուցանիշների վրա:

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

Ամփոփելով կատարված աշխատանքը կարող ենք եզրակացնել.

1. Մինևոյն փորձարարական պայմաններում հինգ տարբեր տեսակի կորբաների և կովկասյան գյուրզայի ինտակտ և արգելափակված ֆերմենտային ակտիվությամբ թույների հակացավային ազդեցությունների հետազոտման արդյունքում ցույց է տրվել, որ NNP-ի (1/10 LD₅₀), OH-ի (1/10 LD₅₀) և MLO-ի (1/20 LD₅₀), թույները ունեն արտահայտված հակացավային ազդեցություն, որը էապես պայմանավորված է PLA₂-ի ֆերմենտային ակտիվությամբ: Ինտակտ և արգելափակցած ֆերմենտային ակտիվությամբ MLO-ի թույնը (LD₅₀) դրսևորում է ցավառաջացնող ազդեցություն, որը ևս էապես պայմանավորված է PLA₂-ի ֆերմենտային ակտիվությամբ:
2. OVEO-ի բաղադրակազմի որակական և քանակական հետազոտությունը ցույց է տվել, որ ծաղկման փուլում հավաքված բույսից ստացված եթերայուղում բարձր քանակությամբ առկա են β-կարիոֆիլեն (8.18 %) և β-կարիոֆիլենի էպոքսիդ (13.36 %):
3. OVEO-ի հակացավային ազդեցությունների տարբեր չափաբաժինների սկրինինգի արդյունքում ընտրվել է ամենաարդյունավետ չափաբաժինը (4.0 %-ոց 0,1 մլ լուծույթ, 3.5 մգ/մուկ), որը

- ցուցաբերել է 84.3 % ցավազրկում, այնինչ ստանդարտ ցավազրկող անալգիկը նույն փուլում ազդել է 67.9 %-ով, իսկ դիկլոֆենակը՝ 69.5 %-ով:
4. MLO-OVEO-ի պատրաստուկի հակացավային ազդեցության հետազոտության արդյունքները ցույց են տվել, որ ոչ միայն պահպանվում է ցավազրկման բարձր տոկոսը, այլ նաև տեղի է ունենում արդյունավետ պիկերի իրար հաջորդում, այսինքն՝ ունենում ենք ավելի երկարատև ցավազրկում:
 5. Համակցված պատրաստուկի քսուք տարբերակի հակացավային և հակաբորբոքային ազդեցությունների հետազոտությունները ցույց են տվել, որ այն ավելի քան 68 %-ով նվազեցնում է բորբոքային ցավը (համեմատության համար՝ դիկլոֆենակի քսուքի հակացավային ազդեցությունը պակաս է 28 %-ից) և շուրջ 50 %-ով նվազեցնում է բորբոքային այտուցի ծավալը (դիկլոֆենակի քսուքը՝ 21.0 %-ով):
 6. Օպիատային ռեցեպտորների անտագոնիստ նալոքսոնի կիրառմամբ կատարված հետազոտությունները ցույց են տվել քսուքի հակացավային ազդեցության նվազում (64.0 %), ինչը թույլ է տալիս եզրակացնել, որ քսուքի ցավազրկման մեխանիզմում ներգրավված են օպիատային ռեցեպտորները:
 7. Կանաբինոիդային CB2 ռեցեպտորների ինվերս ագոնիստ SR144528 կիրառմամբ կատարված հետազոտությունները ցույց են տվել քսուքի հակացավային ազդեցության նվազում (73.0 %), ինչը թույլ է տալիս եզրակացնել, որ քսուքի ցավազրկման մեխանիզմում ներգրավված են կանաբինոիդային ռեցեպտորները:
 8. Քսուքի հնարավոր կողմնակի ազդեցությունների բացահայտմանն ուղղված հետազոտությունները ցույց են տվել, որ այն չունի որևէ մաշկազգոռիչ, ալերգիկ ազդեցություն, չի ազդում կենդանու շարժողական ակտիվության, շնչառության հաճախականության և անոթազարկի վրա:

ԱՏԵՆԱԽՈՍՈՒԹՅԱՆ ԹԵՄԱՅՈՎ ՀՐԱՊԱՐԱԿՈՒՄՆԵՐԻ ՑԱՆԿ

Հոդվածներ

1. L. Parseghyan. Comparative Investigation of Five Cobras' Venoms Analgesic Capacity. "Katchar" Collection of Scientific Articles. International Scientific-Educational Center NAS RA, 2021, 2021-2, 113-124
2. A. Moghrovyan, L. Parseghyan, G. Sevoyan, A. Darbinyan, N. Sahakyan, M. Gaboyan, Z. Karabekian, A. Voskanyan. Antinociceptive, anti-inflammatory, and cytotoxic properties of essential oil, rich with β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide. The Korean Journal of Pain, 2022, 35 (2), 140-151
3. A. Darbinyan, L. Parseghyan, A. Moghrovyan, M. Babajanyan, A. Voskanyan. The transition of pain into anesthesia - the effect of various doses of *Macrovipera lebetina obtusa* venom. Neurochemical Journal, 2023, Vol. 17, No. 4, pp. 662–667. DOI: 10.1134/S1819712423040098

Թեզիսներ

4. A. Voskanyan, M. Antonyan, A. Darbinyan, L. Parseghyan. Pain and venoms. Abstract. The 1st "Beritashvili Talks", Neurophysiological Functions and their Disorders - Interdisciplinary Studies. 2018, pp 17
5. A. Darbinyan, M. Antonyan, H. Koshatashyan, L. Parseghyan, V. Bezuglov, A. Voskanyan. Snake's and arthropod's venom-induced pain-like behavior. Toxicon, 2019, 159, S16
6. L. Parseghyan, A. Voskanyan, A. Darbinyan, M. Antonyan. Antinociceptive potential of cobra venom. Abstract. V International Conference on Biotechnology and Health, pp 106-107
7. A. Voskanyan, L. Parseghyan, A. Darbinyan, A. Mogrovyan. Antinociceptive effect of a combination of phytocannabinoids and snake venoms. Abstract. Rusneurochem. 2022, pp 45

ПАРСЕГЯН ЛИЛЯ МУШЕГОВНА
ИССЛЕДОВАНИЕ АНАЛЬГЕТИЧЕСКОГО И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ КОМБИНИРОВАННОГО
ПРЕПАРАТА ЯДА КАВКАЗСКОЙ ГЮРЗЫ И ЭФИРНОГО МАСЛА ДУШИЦЫ

РЕЗЮМЕ

Работа посвящена получению и исследованию обезболивающего и противовоспалительного препарата на основе змеиного яда и эфирного масла. Нашей задачей было изучить обезболивающее и противовоспалительное действие ядов различных видов кобр и гюрзы кавказской (*Macrovipera lebetina obtusa* (MLO)), с интактной и ингибированной активностью энзимов, а также определить оптимальные дозы ядов с максимально эффективным обезболивающим эффектом. Было также получено эфирное масло дикорастущей душицы обыкновенной Армянского нагорья (*Origanum vulgare*, (OVEO)) и проведено качественное и количественное исследование его состава. Исследовано обезболивающее и противовоспалительное действие различных доз OVEO и сравнено с эффектами стандартных обезболивающих препаратов. Определены наиболее эффективные временные интервалы воздействия всех исследуемых веществ. Приготовлен комбинированный препарат с активными компонентами яд/эфирное масло с наиболее эффективными дозами выбранного яда и эфирного масла и сравнено его обезболивающее действие с соответствующим действием отдельных активных ингредиентов. Определена токсичность комбинированного препарата, его некоторые побочные эффекты, срок годности и возможные механизмы действия.

Исследования проведены на мышах-альбиносах и крысах линии Вистар. Были проведены формалиновый и каррагинановый тесты, тесты «Горячей пластины», «Открытого поля» и тест на раздражение кожи. Проведено GC-MS исследование состава OVEO, определена токсичность ЛД₅₀ состава, а также использовалось устройство PhysioPac для регистрации частот сердечного сокращения (ЧСС) и дыхания. Были исследованы обезболивающие эффекты ядов пяти различных видов кобр и MLO с интактной и ингибированной фосфолипазной активностью.

С помощью формалинового теста было показано, что среди испытанных ядов кобр, наибольший анальгетический эффект - 55,8% и 50,1% соответственно - имели яды кобры королевской и красной. Обезболивающий эффект яда MLO составил 64,1%, а за счет блокирования фосфолипазной активности яд утратил анальгетический эффект на 60%.

Обезболивающее действие различных доз яда MLO также исследовали с помощью формалинового теста, и было показано, что анальгетический эффект яда (1/20 LD₅₀, IP) сменился на ноцицептивный эффект (LD₅₀, IPL) дозозависимым образом.

Также методом GC-MS в разные вегетационные периоды проведено качественное и количественное исследование состава эфирного масла душицы, произрастающей в диком виде на Армянском нагорье. В результате исследования выяснилось, что эфирное масло, полученное из растения, собранного в период цветения, содержит максимальное количество β-кариофиллена и β-кариофилленэпоксида (8,18% и 13,36% соответственно). Поэтому эфирное масло, полученное из растения, собранного в этот период, было выбрано для дальнейших исследований. С помощью формалиновой пробы была определена доза эфирного масла (4%), обладающая наиболее эффективным обезболивающим эффектом (84,3%).

Из сочетания наиболее эффективных обезболивающих доз яда MLO и эфирного масла душицы обыкновенной получен комбинированный препарат яд MLO/OVEO, обезболивающего действие которого исследовано в формалиновом тесте и показан 71,5% эффект обезболивающего действия. Противовоспалительное действие яда MLO/препарата OVEO исследовали с помощью каррагинанового теста. Результаты показали, что указанный препарат уменьшил воспалительный отек на 29%.

Эффективное обезболивающее действие комбинированного препарата было также исследовано в зависимости от времени предварительной обработки и было показано, что наиболее эффективная анальгезия наблюдалась при внутривенном введении (IP) препарата за 30 минут до интраплатантарной инъекции (IPL) формалина.

Оценка срока годности препарата яд MLO/OVEO и токсикологическое исследование показали, что препарат значительно теряет анальгезирующий эффект через 3 месяца приготовления, а диапазон терапевтического действия достаточно узок, поэтому дальнейшие исследования были продолжены с мазевой версией препарата. Применение препарата в виде мази обеспечило обезболивающий эффект в 68,2% в формалиновом, и уменьшение воспалительного отека на 49% в каррагинановом тестах.

Возможные механизмы действия мази изучены с использованием антагонистов опиатных и каннабиноидных рецепторов. Антагонист опиатных рецепторов налоксон ослаблял обезболивающее действие мази на 64%, а инверсный агонист (антагонист) каннабиноидных рецепторов SR144528 ослаблял обезболивающее действие мази на 73%, что свидетельствует о соответствующей степени их участия в антиноцицептивных механизмах. С помощью теста «Горячей пластины» показано, что термочувствительные рецепторы TRPV1, которые также способны трансдуцировать болевые раздражители, не вовлечены в механизм анальгетического действия мази.

Анальгезирующее и противовоспалительное действие комбинированного препарата (раствора для инъекций (IP) и мази) также сравнивалось с действием стандартных анальгезирующих и противовоспалительных препаратов и показало достоверно более высокую эффективность.

Возможные побочные эффекты мази исследовали с помощью теста на раздражение кожи, теста «Открытого поля» и прибора PhysioPac. Исследования показали, что мазь не оказывает раздражающего и аллергического действия на кожу, не влияет на двигательную активность, а также на ЧСС и частоту дыхания у животных.

PARSEGHYAN LILYA

INVESTIGATION OF THE ANALGESIC AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF THE COMBINED PREPARATION OF BLUNT-NOSED VIPER VENOM AND OREGANO ESSENTIAL OIL

SUMMARY

The work is dedicated to obtaining and researching an analgesic and anti-inflammatory preparation based on snake venom and essential oil. Our task was to investigate the analgesic and anti-inflammatory effects of different species of cobra and Blunt-nosed viper (*Macrovipera lebetina obtusa*, MLO) venoms with intact and inhibited enzyme activity and to carry out a comparative analysis to determine the effective dose of the venom with the most effective analgesic effect. To check the possible pain-modulating effect of different doses of the selected venom (with intact and inhibited enzyme activity). To obtain the essential oil of oregano from Armenian highlands (*Origanum vulgare*, OVEO) and carry out a qualitative and quantitative study of its composition. To investigate the analgesic and anti-inflammatory effects of different doses of OVEO and to compare them with the effects of analgesic drugs standards. To determine the most effective time intervals for the effects of all the investigated substances. To prepare a venom/essential oil combined preparation with the most effective doses of the selected venom and essential oil and compare its analgesic effect with the analgesic effects of individual active ingredients. To determine the toxicity of the combined preparation, some side effects, shelf life, and possible mechanisms of action.

Studies were performed on albino mice and Wistar rats. The formalin test, carrageenan test, hot-plate test, open-field test, skin irritation test, GC-MS, and toxicological research were carried out, and PhysioPac device was used.

The analgesic effects of five different species of cobras and MLO venoms with intact and phospholipase-blocked activity were investigated. Using the formalin test, it was shown that among tested cobras' venoms, the highest analgesic effect, 55.8% and 50.1%, respectively, had the venoms of the king and the red cobras. The analgesic effect of the venom of the MLO was 64.1%, and due to the blocking of the phospholipase activity of the venom, it lost its analgesic effect by 60%.

The pain-inducing effect of different doses of *Macrovipera lebetina obtusa* venom was also investigated using the formalin test, and it was shown that the venom's analgesic effect (1/20 LD₅₀) changed to the nociceptive effect (LD₅₀) in a dose-dependent manner.

A qualitative and quantitative study of the composition of the essential oil of oregano, which grows wild in the Armenian highlands, was also carried out using the GC-MS method in different vegetation periods. As a result of the study, it became clear that the essential oil obtained from the plant collected during the blossoming period contained the maximum amount of β -caryophyllene and β -caryophyllene epoxide (8.18% and 13.36%, respectively). Therefore, the essential oil obtained from the plant collected during this period was selected for further research. Using the formalin test, the dose of essential oil (4%) with the most effective analgesic effect (84.3%) was determined.

From the combination of the most effective analgesic doses of MLO venom and essential oil of oregano, we obtained a combined MLO venom/OVEO preparation, whose analgesic effects were investigated by the formalin test, and 71.5% effective analgesic effect was shown. The anti-inflammatory effects of MLO venom/OVEO preparation were investigated by the carrageenan test. The results showed that mentioned preparation reduced the inflammatory swelling by 29%.

The effective analgesic effect of the combined preparation was also investigated depending on the time of interval of the pretreatment and it was shown that the most effective analgesia was observed when the preparation was applied 30 minutes before formalin injection.

The evaluation of the shelf life of the MLO venom/OVEO preparation and the toxicological study showed that the preparation significantly loses its analgesic effect after 3 months of preparation, and the range of toxic and therapeutic ranges is quite narrow, so further studies were continued with the ointment version of the MLO venom/OVEO preparation. A study of the analgesic effects of the ointment showed a 68.2% effective analgesic effect using the formalin test, and a 49% reduction in inflammatory edema by the ointment using the carrageenan test.

The possible mechanisms of action of the ointment have been studied using opiate and cannabinoid receptor antagonists. The opiate receptor antagonist naloxone weakened the analgesic effect of the ointment by 64%, and the cannabinoid receptor inverse agonist (antagonist) SR144528 weakened the ointment's analgesic effect by 73%, what indicates the degree of their involvement in antinociceptive mechanisms. Using the hot plate test, it was shown that thermo sensitive TRPV1 receptors, which also are able to transduce pain stimuli, are not involved in the mechanism of the analgesic effect of the ointment.

The analgesic and anti-inflammatory effects of the combined preparation (solution of injection (IP) and ointment) were also compared with those of standard analgesic and anti-inflammatory drugs and showed a significantly higher efficacy.

The possible side effects of the ointment were investigated using the skin irritation test, the open field test, and the PhysioPac equipment. Research has shown that the ointment does not have any skin irritation or allergic effects, and does not affect the animal's motor activity, heart, and respiratory rates.