

вещества G10 также позволяют сделать вывод о его гепатопротекторном действии.

Полученные данные открывают перспективы дальнейших исследований фармакологических свойств вещества G10, возможности включения его в качестве фитотерапевтического средства в комплекс профилактических и лечебных мероприятий при остром токсическом гепатите.

რეზიუმე

მცენარე ZHUZGUN-დან მიღებული სუბსტანცია G10-ის ჰეპატოპროტექტორული ეფექტურობა ექსპერიმენტული ტოქსიკური ჰეპატიტის დროს

ი.უიზბაევა, გ.აკოლატოვა, დ.ტარჯანოვა, კ.მუკანოვი

ასტანას სამედიცინო უნივერსიტეტი, ზოგადი ფარმაკოლოგიის კათედრა, ნურ-სულტანი, ყაზახეთი

სტატიაში წარმოდგენილია სისხლის ბიოქიმიური კვლევის შედეგები და ღვიძლში განვითარებული მორფოლოგიური ცვლილებები ექსპერიმენტში პარაცეტამოლური ჰეპატიტის და მცენარე

ZHUZGUN-დან მიღებული ახალი ნივთიერება G10-ის სხვადასხვა დოზის კუჭში შეყვანის პირობებში ვირთაგვებში.

ჰეპატოპროტექტორული თვისებების კვლევა ჩატარდა 70 თეთრ უჯიშო ვირთაგვაზე წონით 180-250 გ. მცენარე ZHUZGUN-დან მიღებული ახალი ნივთიერება G10 წარმოადგენს უსუნო, წყალში ცუდად ხსნად, ყავისფერ ფხვნილს.

კვლევის შედეგების საფუძველზე ავტორები დაასკვნინან, რომ მცენარე ZHUZGUN-დან მიღებული ახალი ნივთიერება G10 სხვადასხვა დოზით ახდენს მნიშვნელოვან დადებით გავლენას ბიოქიმიური პარამეტრების დინამიკაზე სისხლის შრატში ექსპერიმენტული მწვავე პარაცეტამოლური ჰეპატიტის დროს. ვირთაგვების შინაგანი ორგანოების პათომორფოლოგიური კვლევის შედეგები ნივთიერება G10-ის კუჭში შეყვანის პირობებში ადასტურებს მის ჰეპატოპროტექტორულ მოქმედებას.

მიღებული შედეგები ხსნის ახალ პერსპექტივებს ნივთიერება G10-ის შემდგომი ფარმაკოლოგიური კვლევისათვის ფიტოთერაპიული საშუალების სახით პროფილაქტიკური და სამკურნალო ღონისძიებების კომპლექსში მწვავე ტოქსიკური ჰეპატიტის დროს.

COUMARINS FROM *DAPHNE AXILLIFLORA* (KEISSE.) POBED. AND THE ANATOMICAL CHARACTERISTICS OF ITS LEAVES AND STEMS

¹Moshiashvili G., ¹Mchedlidze K., ¹Aneli J., ²Pichette A., ^{1,2}Mshvildadze V.

¹Tbilisi State Medical University, Iovel Kutateladze Institute of Pharmacochimistry, Tbilisi, Georgia;

²Laboratoire LASEVE, Université du Québec à Chicoutimi, Département des Sciences Fondamentales, Chicoutimi, Québec, Canada

The genus *Daphne* L. belongs to the Thymelaeaceae family and is one of the most diverse genera of this family with over 90 described species [14]. This genus is found widely across Europe, Asia and Northern Africa, with eight species growing in Georgia: *D. mezereum* L., *D. pontica* L., *D. albowiana* Woronow ex Pobed. (*D. pontica* subsp. *haematocarpa* Woronow), *D. glomerata* Lam. (*D. imerica* C.Koch); *D. caucasica* Pall., *D. axilliflora* (Keissl.) Pobed. (*D. caucasica* Pall. var. *axilliflora* Keissl); *D. transcaucasica* Pobed. (*D. oleoides* auct.) and *D. pseudosericea* Pobed. *D. axilliflora* (Keissl.) Pobed. and *D. pseudosericea* Pobed. are endemic species of the Caucasus [1].

The genus *Daphne* is used in traditional medicine, especially in China and the Middle East. It is used for the treatment of gonorrhoea, skin diseases, aches, rheumatism, cancer, malaria and inflammations [7,15,16]. Biological and pharmacological research has shown that extracts and compounds isolated from different *Daphne* species possess significant antimicrobial, antioxidant, cytotoxic, antiviral and several other effects [5,11-13,15].

The chemical composition of the genus *Daphne* is quite diverse. The most important classes of compounds obtained are coumarins, flavonoids, lignans and terpenoids. Several alkaloids, steroids and phenylpropanoids have also been isolated

from this genus. *Daphne* is known for the content of daphnane diterpenes, a wide range of mono-, di- and tricoumarins, and flavonoid glycosides [8,9,12,14,16].

D. axilliflora is an endemic species of the Caucasus [1]. The plant is widely spread in most parts of Georgia, commonly in forested areas. These are deciduous shrubs reaching heights of up to 2 m. The stems are thin, older ones with greyish bark, while young stems have a dark purple bark; stems are glabrous, except under the inflorescences of young stems that are slightly pubescent. Leaves on flower-bearing branches are small, 2-3 cm long and 0.5-0.75 cm wide, elongate-oval, cuneate at the base, obtuse at the tip; on non-flower bearing branches they are larger, 5-7 cm long and 1-1.5 cm wide, gradually cuneate at the base, acute at the tip; they are glabrous, adaxial part green, abaxial side pale green; Flowers bisexual, 4-merous, perianth tubular, white, fragrant; flowers are grouped together at the tips of branches in numbers of 7-12 positioned on shortened stems. Perianth tubular, thinly pubescent; four folded lobes of the perianth are wide-ovate, twice as short as the tube. Stamens 8, twice as many as perianth lobes, in two series, filaments short or absent, attached to the base of the perianth tube. The ovary is superior, glabrous, and almost sessile; the style is capitate. The fruit is a bright red drupe [1].

The stable diagnostic traits that this study was focused on include: the form, type and distribution pattern of trichomes; shape and interposition of the leaf's epidermal cells; type and position of stomata; structure of the leaf's parenchyma; details of the vascular tissue's structure and the presence and form of intracellular structures [2,3].

The aim of the study was the determination of the stable diagnostic traits of the stems and leaves of *D. axilliflora* (Keissl.) Pobed. and a preliminary phytochemical study of this species. The identified diagnostic characteristics provide referential data for the correct identification of the plant material of *D. axilliflora*.

Material and methods. Plant material

The plant material of *D. axilliflora* was obtained in 2018 in the Samtskhe–Javakheti region of Georgia, around the Bakuriani village. The plant material was identified and collected by J. Aneli. A voucher specimen is kept in the I. Kutateladze Institute herbarium (specimen code #12845).

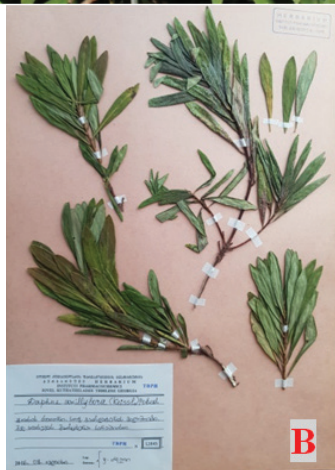


Fig 1. A - *D. axilliflora* whole plant during fruiting, Bakuriani; B - *D. axilliflora* voucher specimen

Extraction and isolation

The methanol extract of *D. axilliflora*'s joined leaves and stems was obtained by reflux extraction with boiling methanol. Lipids and other non-polar compounds were removed applying pre-extraction by hexane and chloroform. The methanol extract was partitioned between water and ethyl acetate. The aqueous phase was later partitioned between water and n-butanol, saturated with water. The dry butanol fraction was subjected to column chromatography on silica gel eluting with CHCl_3 -MeOH- H_2O (50:10:0.5). The process resulted in 3 fractions. Fraction 2 was further separated into the pure compounds 1 and 2 with

HPLC using a - Kinetex 5 μm XB - C18 (100 A, 250x21.2) column, solvent A: acetonitrile with 0.1% formic acid, solvent B: water. The gradient was: A 5% for 5 min, to 10% for 35 min, to 45% till 40 min.

TLC analysis. Thin layer chromatography was performed on Silica gel 60 F 254 (Merck) plates, the mobile phase was Chloroform: Methanol: Water (50:10:0.5). The plates were visualized with H_2SO_4 20% in methanol (Terpenoids) and NP/PEG (Polyphenols).

HPLC analysis. The methanol extract was dissolved in pure methanol and subjected to HPLC analysis on an Agilent 1200 Series HPLC System with diode array and MS detectors (negative ESI-MS) on a C-18 Phenomenex column (d - 4.6 mm, l - 250 mm), solvent A: acetonitrile with 0.1% formic acid, solvent B: water. The gradient was A 10% to 35% for 35 min, to 100% till 45 min. Flow rate was 1.0 ml/min. Retention times for compound 1 - 6.68 min, compound 2 - 10.44 min (Fig. 2).

NMR. The chemical structures of isolated individual compounds were elucidated using a (Bruker Ultra Shield 400 MHz) NMR spectrometer with ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC and HMBC experiments. The samples for the NMR analysis were dissolved in deuterated DMSO.

Anatomical analysis. Samples for microscopic slides were prepared from living, non-fixed material with a metal razor. Longitudinal, transverse and epidermal sections were prepared from the shoots, the medial part of the leaf blade and the leaf central vein. The samples were stained with a safranin solution for 24 hours and were placed on a glass slide in a drop of glycerine. An optical microscope Carl Zeiss, Jena was used for the micro-structural study. Images were obtained by a digital camera (Canon Digital IXV575).

Results and discussion. The visualized TLC plates showed and abundance of terpenoid and polyphenolic compounds present in the methanol extract, which corresponds well with the typical composition of this plant genus.

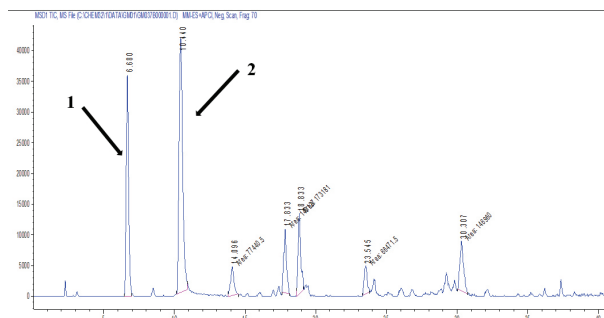


Fig. 2. HPLC-MS chromatogram of the methanol extract of *Daphne axilliflora*

The isolated compounds 1 (Daphnin) and 2 (Daphnetin) were identified based on their ^1H NMR, ^{13}C , COSY, HMBC and HSQC spectral data. The ^{13}C chemical shifts of 1 were: (C2 - C10) 160.1, 113.4, 144.7, 118.3, 114.5, 148.2, 134.0, 144.7, 112.3; sugar moiety (C'1 - C'6) 101.7, 73.3, 77.3, 69.8, 75.8, 60.8, and an m/z 339 [M-H] $^-$. The 2D NMR data suggested that the glucose is substituted on C7, corresponding to daphnin.

The ^{13}C chemical shifts of 2 (C2 - C10) 160.4, 111.3, 144.0, 129.3, 113.1, 161.3, 102.3, 155.6, 111.3, and an m/z 177 [M-H] $^-$ - corresponding to daphnetin. The spectral data of daphnetin and daphnin were in excellent agreement with those reported in the literature [9].

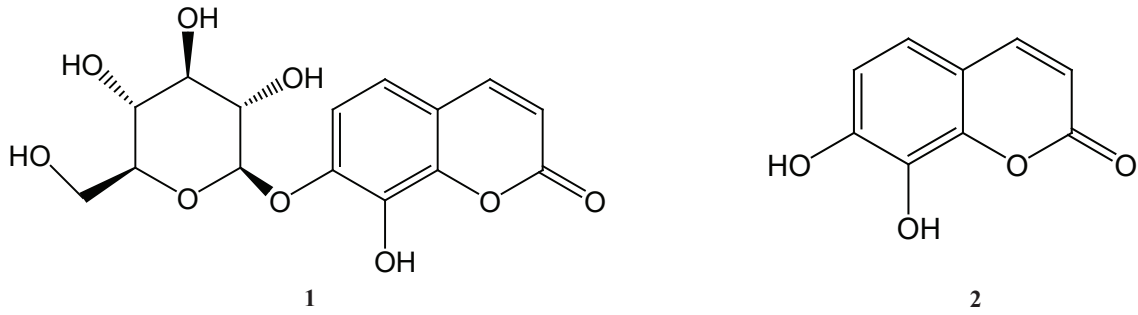


Fig. 3. Compound 1 (Daphnin) and compound 2 (Daphnetin)

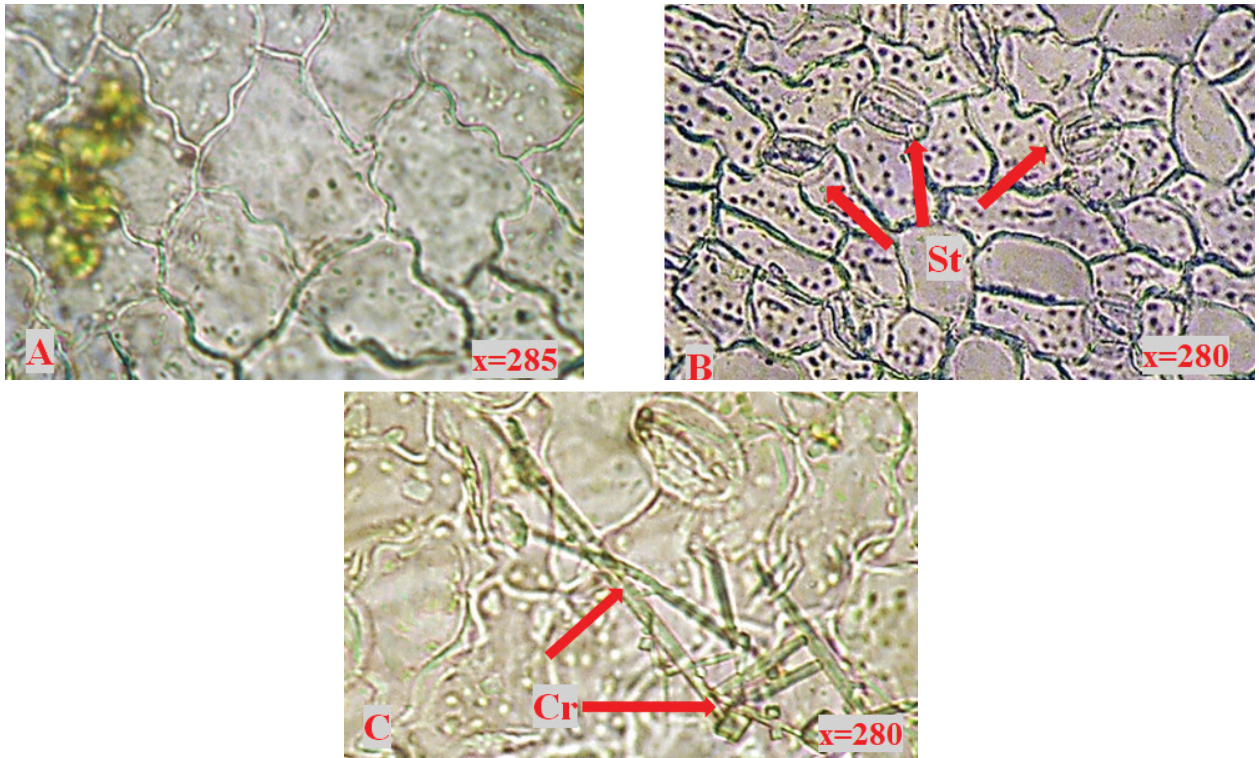


Fig. 4. *D. axilliflora* leaf epidermis; A- upper; B, C – lower; St – stomata; Cr – crystals

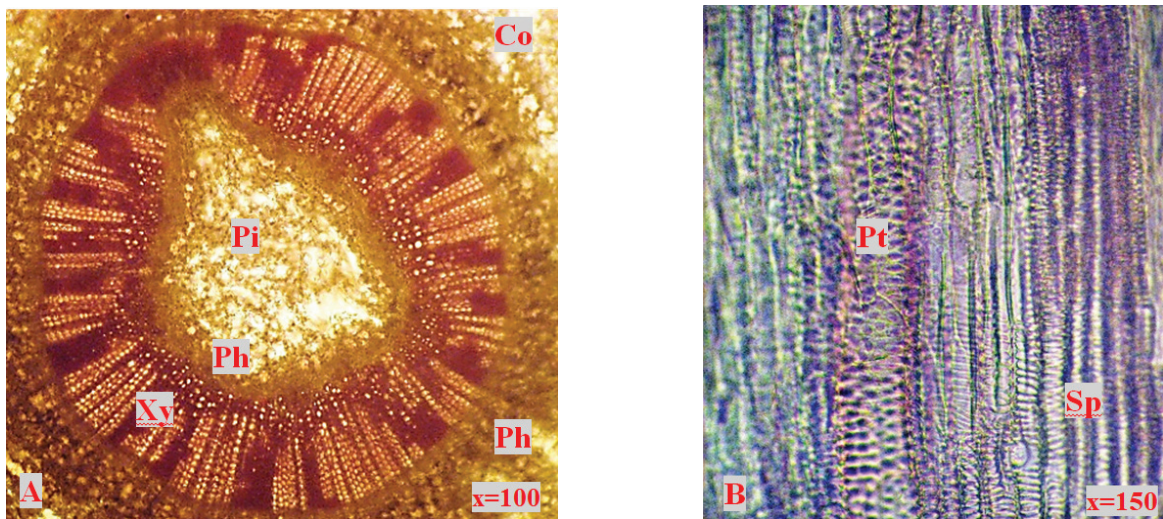


Fig. 5. *D. axilliflora* - transverse section of the stem; Pi – pith; Xy – xylem; Ph – phloem; Co – cortex; B - longitudinal section of the stem, xylem vessels; Sp – spiral thickening; Pt - pitted thickening

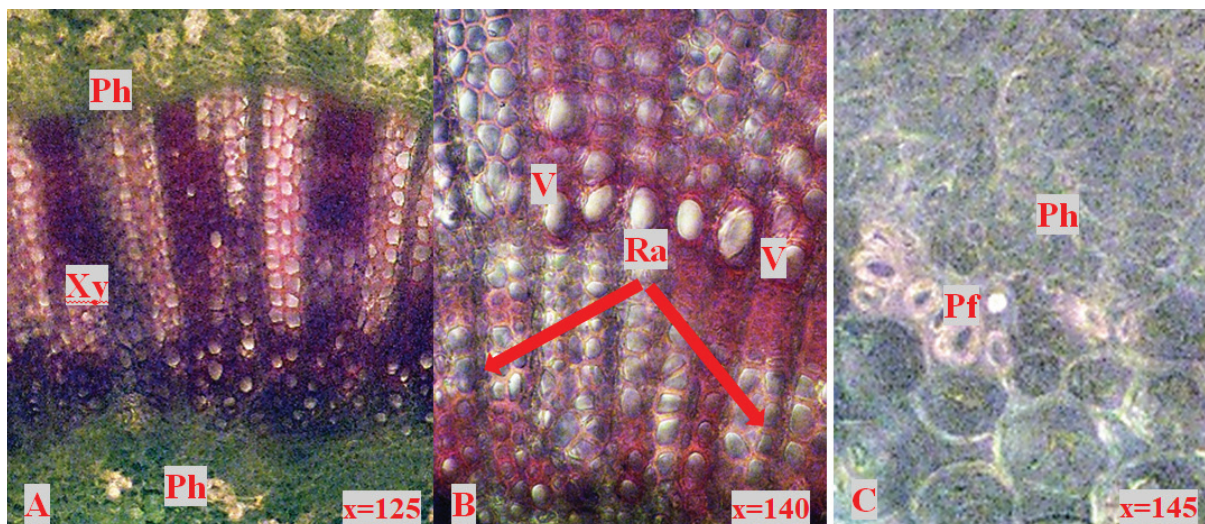


Fig. 6. *D. axilliflora* vascular cylinder section; A – xylem; B – xylem; C – phloem; Xy – xylem; Ph – phloem; Pf – phloem fibres; V – vessels; Ra – radial ray

Anatomical characteristics. The epidermis at both surfaces of the leaves is single layered. Cells of the upper epidermis are oriented chaotically, distinctly curved and with curved walls. On the lower epidermis also chaotic, curved, with curved walls. Leaves are hypostomatic. Stomata anomocytic, chaotically dispersed on the surface of the leaf. The inner walls of the guard cells are unequally thickened. The stomatal pore is spindle shaped. Cells of the lower epidermis contain well conspicuous chloroplasts, rhomboid and needle shaped crystals (Fig. 4).

The vascular system is monocyclic and bilateral. Wood is diffuse-porous. Annual rings are not very conspicuous. The tracheid and vessel openings are positioned in groups and radial files. Thin bands of tracheal elements are noticeable in the wood. Transition zones between primary and secondary xylem are relatively well distinguishable. Vessel openings are oval. Xylem parenchyma is apotracheal and the interposition on parenchymous cells is scanty metatracheal. Mechanical elements of the wood differ by diameter and wall thickening, both from each other as well as the xylem parenchyma. The borders of annual ring are not prominent. Radial xylem rays are distinctly in single-rows. When approaching vessel openings they do not bend and do not expand through the entire length of the xylem cylinder. Walls of vessels are characterized by spiral and pitted thickening. Perforation plates are fully perforated. Radial xylem rays heterogeneous, in a single row, short or long, respectively of 2 to 4 or up to 19 cells tall (Figs. 5, 6). Phloem fibers are present in relatively small numbers.

This is the first phytochemical study of a Caucasian endemic plant *Daphne axilliflora*. The plant material shows an abundance of terpenoid and polyphenolic secondary metabolites, similar to other members of this genus [16]. Two known coumarins were isolated from the methanol extract of the aerial parts. The identified structural peculiarities provide valuable information for the correct identification and standardization of the *D. axilliflora* plant material.

Acknowledgments. This work was supported by Shota Rustaveli National Science Foundation; grant PhD_17_34; project – “Phytochemical and biological study of *Daphne glomerata* Lam, a native species of Georgia”.

REFERENCES

- საქართველოს ფლორა, ტ. IX, გვ. 50 – 60 “მეცნიერება” თბილისი 1984 წ.
- Н.А.Анели: Анатомическое строение междуузлия, как диагностический признак; Химия и биология активных веществ лекарственных растений Грузии, изд. «Мецниереба» Тбилиси 1969 г., ст.148-165
- Н.А. Анели: Атлас Эпидермы листа; изд. Мецниереба, Тбилиси 1975г., ст.36-38;
- Флора СССР, 1949 г., Том XV, стр. 490-491
- Alfarius Eko Nugrohoa et al. Daphnane Diterpenoids from *Daphne altaica* Natural Product Communications, 2016 Vol. 11 No. 8 1073 – 1075
- Baek-Soo Han et al.; Daphnane and Phorbol Diterpenes, Anti-neuroinflammatory Compounds with Nurr1 Activation from the Roots and Stems of *Daphne genkwa* Pharm. Bull. (2017) 40, 2205–2211
- Baqar S. R., Medicinal and Poisonous Plants of Pakistan. Printas Press, 1989, p. 161
- Dar M. Y., Ara T., Akbar S., A New Prenylated Coumarin from *Daphne oleoides* and its Cytotoxic Activity, Chemistry of Natural Compounds, 2019, Vol. 55, No. 1, January
- Jewers K., & Zirvi K. (1978). The Coumarin Glycosides of *Daphne acuminata*: Use of ¹³C-NMR Spectroscopy for their Identification. *Planta Medica*, 33(04), 403–406.
- Juskovic M. et al. (2017). Phytochemical screening, antioxidants and antimicrobial potential of leaves of *Daphne laureola* L. *Oxidation Communications* 40. 1058-1069
- Kouharu Otsuki et al. Daphneodorins A–C, Anti-HIV Gnidi-macrin Related Macrocylic Daphnane orthoesters from *Daphne odora*, *Organic Letters* 2020 (1):11-15
- Qian Sun et al. Flavans with cytotoxic activity from the stem and root bark of *Daphne giraldii*, *Royal Society of Chemistry Advances* 2016, 6, 55919-55929
- Sovrlić M. et al. Phytochemical, Antioxidant and Antimicrobial Profiles of Extracts of *Daphne alpina* (Thymelaeaceae) L Leaf and Twig from Mt Kopaonik (Serbia). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* (2015).14(7), 1239-1248
- The Plant List, 2012, <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=daphne> Working list of all known plant species.
- Tongur T., Erkan N., Ayranci E., Investigation of the compo-

sition and antioxidant activity of acetone and methanol extracts of *Daphne sericea* L. and *Daphne gnidioides* L. *Timur J Food Sci Technol*, 2018, 55(4):1396–1406
16. Xu, W.-C., Shen, J.-G., & Jiang, J.-Q. (2011). *Phytochemical and Biological Studies of the Plants from the Genus Daphne. Chemistry & Biodiversity*, 8(7), 1215–1233

SUMMARY

COUMARINS FROM *DAPHNE AXILLIFLORA* (KEISSEL.) POBED. AND THE ANATOMICAL CHARACTERISTICS OF ITS LEAVES AND STEMS

¹Moshiashvili G., ¹Mchedlidze K., ¹Aneli J., ²Pichette A., ^{1,2}Mshvildadze V.

¹Tbilisi State Medical University, Iovel Kutateladze Institute of Pharmacochemistry, Tbilisi, Georgia; ²Laboratoire LASEVE, Université du Québec à Chicoutimi, Département des Sciences Fondamentales, Chicoutimi, Québec, Canada

The aim of the study was to determine the stable diagnostic traits of a Caucasian endemic plant *Daphne axilliflora* (Keissl.) Pobed. and study its phytochemical composition.

The following stable diagnostic characteristic were identified during the microstructural analysis: leaf surface glabrous, hypostomatic, dorsoventral; epidermal cells chaotic; curved with curved walls on both the upper and lower epidermis; stomata anomocytic; well visible chloroplasts, rhomboid and needle shaped crystals in lower leaf epidermis; leaf vascular bundles reverse-collateral; vascular system monocyclic, bilateral; wood diffuse-porous; xylem parenchyma is apotracheal, scanty metatracheal; vessel walls are predominantly characterized by spiral and pitted thickening; collenchyma lamellar; radial rays in single rows, heterogeneous.

Phytochemical analysis showed the presence of terpene and phenolic substances, including coumarins. Two well-known coumarins (daphnin and daphnetin) were isolated and identified. **Keywords:** *Daphne axilliflora*, Plant Anatomy, Phytochemistry, Coumarins.

РЕЗЮМЕ

КУМАРИНЫ ВОЛЧЕЯГОДНИКА *DAPHNE AXILLIFLORA* (KEISSEL.) POBED. И АНАТОМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЕГО СТЕБЛЕЙ И ЛИСТЬЕВ

¹Мошиашвили Г.М., ¹Мчедлидзе К.З., ¹Анели Дж.Н., ²Пишет А., ^{1,2}Мшвилдадзе В.Д.

¹Тбилисский государственный медицинский университет, Институт фармакохимии им. И. Кутателадзе, Грузия; ²Квебекский университет, Шикутими, Канада

Целью исследования явилось определение стабильных диагностических признаков стеблей и листьев произрастающего в Грузии и эндемика Кавказа из рода волчегородника - *Daphne axilliflora* (Keissl.) Pobed. и фито-

химическое изучение полученного из них метанольного экстракта. В ходе микроструктурного анализа выявлены следующие стабильные диагностические признаки: лист бифациальный, гипостоматический, дорсовентральный; клетки эпидермиса расположены хаотично; изогнутые с изогнутыми стенками на верхнем и нижнем эпидермисе; устьица парацитные; в эпидермисе листа хорошо видны хлоропласты, ромбовидные и игольчатые кристаллы; сосудистые пучки листьев обратно-коллатеральные; сосудистая система моноциклическая, билатеральная, древесина диффузно-пористая, древесная паренхима апотрахеальная и скудно мататрахеальная; стенки сосудов спирально утолщены; колленхима пластинчатая; радиальные лучи однорядные, неоднородные.

Фитохимический анализ показал наличие терпеновых и фенольных веществ, в том числе кумаринов. Выделено и идентифицировано два известных кумарина – дафнин и дафнетин.

რეზიუმე

DAPHNE AXILLIFLORA (KEISSEL.) POBED.-ს კუმარინები და მისი ფოთლისა და ღეროს ანატომიური თავისებურებანი

¹გ.მოშიაშვილი, ¹კ.მჭედლიძე, ¹ჯ.ანელი, ²ა.პიშეტი, ^{1,2}ვ.მშვილდაძე

¹თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, ი.ქუთათელაძის სახ. ფარმაკოქიმის ინსტიტუტი, საქართველო; ²კვებეკის უნივერსიტეტი, შიკუტიმი, კანადა

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა საქართველოში გავრცელებული სახეობის *Daphne axilliflora* (Keissl.) Pobed.-ის ღეროს და ფოთლის მდგრადი სადიაგნოსტიკო ნიშნების შესწავლა და მათგან მიღებული ექსტრაქტების ბიოლოგიური აქტივობის შეფასება.

მცენარის მიკროსტრუქტურული კვლევის შედეგად დადგინდა შემდეგი სახის მდგრადი სადიაგნოსტიკო ნიშნები: ფოთოლი ბიფაციალური ფორმის, დორსოვენტრალური სტრუქტურის, ჰიპოსტომატური. ზედა და ქვედა ეპიდერმისის უჯრედები არადაგვირგვინებული, მრუდხაზიანი და მრუდკედლიანი; ფოთლის ქვედა ეპიდერმისში გამოკვეთილია ქლოროპლასტები, რომბოიდური და იგოლხაზური კრისტალები. სავენტილაციო აპარატის განლაგება ქოროციტური, ბაგე ანომოციტური აგებულების. ფოთლის გამტარი ქსოვილი ჭურჭელობოჭოვანი, უკუ-კოლატერალური სტრუქტურით ხასიათდება. ტრანზიტორული სისტემა მონოციკლური, ბილატერალური; მერქანი გაფანტულჭურჭლოვანი, აპოტრაქეალური და მწირი მეტატრაქეალური; ჭურჭელების კედლები ძირითადად სპირალურად გასქელებულია; რადიალური სხივები - ერთრიგის, პეტეროგენული.

ფიტოქიმიურმა კვლევამ დაადასტურა მცენარეში ტერპენული და პოლიფენოლური ნაერთების, მათ შორის, კუმარინების არსებობა. გამოყოფილია და იდენტიფიცირებულია ორი ცნობილი კუმარინი - დაფინი და დაფნეტინი.