АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на соискание степени доктора философии (PhD) по образовательной программе «8D05101 – Биология»

Айтынова Арайлым Елдосқызы

Исследование биологической активности фитопрепарата из лопуха войлочного (*Arctium tomentosum* Mill.)

Общая характеристика работы. Диссертационная работа посвящена исследованию биологической активности CO_2-экстракта из корня *Arctium tomentosum* Mill. в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Актуальность темы диссертации.

Лекарственные растения остаются фундаментальным ресурсом фармакотерапии. Особый интерес представляет представитель семейства *Asteraceae* (Сложноцветные) – *Arctium lappa* L. (Лопух большой), корень которого традиционно используется в форме экстрактов для коррекции дерматологических, гастроэнтерологических и гепатобилиарных нарушений. Терапевтический профиль лопуха большого обусловлен высокой концентрацией биологически активных соединений (БАС): фенольных кислот (в частности, хлорогеновой и кофейной), флавоноидов (кверцетина, рутина, лютеолина и апигенина) и специфических лигнанов (арктиин, арктигенин). Данный комплекс соединений определяет широкий спектр фармакологической эффективности растения, включая антиоксидантный, противовоспалительный, гепатопротекторный, противоопухолевый и антибактериальный эффекты.

Несмотря на значительный объём данных по *A. lappa*, другие виды рода *Arctium* остаются недостаточно изученными, что ограничивает представления о хемосистематическом и фармакологическом разнообразии данного таксона. В этой связи особый интерес представляет *Arctium tomentosum* Mill., широко распространённый в природных экосистемах и характеризующийся высокой экологической адаптивностью и доступностью сырьевой базы. Фрагментарность данных о фитохимическом профиле и биологическом потенциале данного вида лопуха обосновывает необходимость его комплексного исследования, особенно в аспекте коррекции гепатобилиарных патологий, число которых в нынешнее время возрастает в силу ряда причин.

Рост заболеваемости печени обусловлен мультифакторной этиологией: от токсических гепатопатий до метаболически ассоциированной жировой болезни печени (МАЖБП). Печеночная дисфункция в сочетании с нарушениями углеводного и липидного обмена инициирует каскад системных реакций: гипергликемию, дислипидемию и инсулинорезистентность, что формирует замкнутый цикл метаболических расстройств. Эти процессы тесно коррелируют с риском развития сахарного диабета 2 типа и сердечно-сосудистых осложнений. На органном уровне накопление триглицеридов и активация перекисного окисления липидов приводят к трансформации стеатоза в стеатогепатит. В отсутствие адекватной фармакотерапии хроническое воспаление стимулирует фиброгенез, при котором функциональная ткань замещается соединительной, что неизбежно прогрессирует в цирроз.

Несмотря на широкое применение классических растительных гепатопротекторов, в частности на основе силимарина, цинарина, глицирризинов и куркумина, проблема коррекции комплексных метаболических поражений печени остается открытой. Селективная направленность существующих средств, зачастую не охватывающая весь спектр системных обменных нарушений, а также риск развития нежелательных эффектов при длительной высокодозной терапии – таких как желчегонная гиперстимуляция (у цинарина и куркумина) или псевдогиперальдостеронизм (у глицирризинов) – в сочетании с высокой ресурсозависимостью производства и отсутствием локальной сырьевой базы для

ряда интродуцированных видов, определяют необходимость расширения арсенала препаратов политропного действия на основе доступного отечественного растительного сырья.

В этом контексте предполагается, что *A. tomentosum*, обладая уникальным хемосистематическим профилем, может рассматриваться как перспективный источник биологически активных соединений с комплексным механизмом действия. Обоснованием для изучения данного вида выступает гипотеза о высокой фармакологической ценности липофильного комплекса, извлекаемого методом субкритической CO_2-экстракции. Предполагается, что содержание фенольных соединений (фенолкарбоновых кислот и флавоноидных гликозидов) в составе полученнного экстракта предопределят его биологический потенциал. Литературные данные о фитохимическом родстве видов рода *Arctium* позволяют предположить, что синергизм полифенольных компонентов в составе CO_2-экстракта *A. tomentosum* позволит интегрировать цитопротекцию с модуляцией ключевых звеньев патологических нарушений.

В отличие от классических фармацевтических технологий, базирующихся на использовании традиционных экстрагентов (воды, этанола и водно-спиртовых смесей) в процессах мацерации, перколяции и экстракции в аппарате Сокслета, в настоящем исследовании применен метод субкритического экстрагирования с использованием диоксида углерода (ГОСТ 8050-85). Данный подход относится к категории «зеленых» технологий, поскольку исключает стадию термического упаривания, обеспечивая экологическую безопасность процесса и нативную сохранность термолабильных биологически активных вещест. Полная декомпрессия газа на финальном этапе экстракции гарантирует отсутствие следовых количеств экстрагента в конечном продукте, что обусловливает его чистоту и экологическую безопасность.

Резюмируя вышеизложенное, выбор *A. tomentosum* в качестве объекта исследования продиктован его недостаточной изученностью на фоне высокой биологической доступности в Республике Казахстан. Синергизм вторичных метаболитов данного вида и технологических преимуществ субкритической CO_2-экстракции позволяет создать оригинальный отечественный фитопрепарат мультитаргетного действия. В свою очередь исследование биологической активности данного фитопрепарата, включающей оценку его безопасности и эффективности на патогенез метаболических нарушений и печеночной интоксикации является актуальной задачей, стратегически значимой для развития импортозамещающего фармацевтического производства.

Цель работы: Изучение биологической активности фитопрепарата из корня *Arctium tomentosum* Mill. в условиях *in vitro* и *in vivo.*

Задачи исследования:

1. Определить содержание общего количества флавоноидов и фенольных кислот, идентифицировать полифенольный состав фитопрепарата, полученного методом CO_2-экстракции из корня *Arctium tomentosum* Mill. и оценить его антиоксидантный потенциал DPPH и FRAP;

2. Изучить цитотоксическое влияние исследуемого фитопрепарата на культуре мононуклеарных клеток в МТТ-тесте;

3. Оценить антимикробную активность фитопрепарата на референс-штаммах грамположительных бактерий (*Staphylococcus aureus),* грамотрицательных бактерий *(Escherichia coli)* и дрожжеподобных грибов (*Candida albicans)*;

4. Исследовать показатели массы тела и внутренних органов, гематологические и биохимические показатели крови, а также гистоструктуру висцеральных органов мышей в остром и подостром эксперименте;

5. Оценить морфофункциональное состояние мышей, включая показатели массы тела и органометрические значения, биохимические показатели сыворотки крови, индекс инсулинорезистентности и гистоструктуру печени в исследовании эффективности

фитопрепарата при метаболическом синдроме, индуцированном высокоуглеводным рационом;

6. Изучить биохимические показатели сыворотки крови, маркеры перекисного окисления липидов, а также гистоструктуру и морфометрию печени на модели CCl_4-индуцированной гепатотоксичности у мышей.

Объекты исследования: CO_2-экстракт из корня *Arctium tomentosum* Mill. («фитопрепарат», «ФТ»), мононуклеарные клетки периферической крови, референс-штаммы грамположительных бактерий (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P), грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli* ATCC 11229) и дрожжеподобных грибов (*Candida albicans* ATCC 10231), мыши линии Swiss.

Предмет исследования: общее содержание флавоноидов и фенольных кислот, полифенольный состав исследуемого фитопрепарата и его способность нейтрализовывать свободные радикалы; биологическая активность фитопрепарата *in vitro* (антимикробная активность в отношении вышеуказанных референс-штаммов микроорганизмов и цитотоксичность на культуре мононуклеарных клеток; биологическая активность фитопрепарата *in vivo* (острая и подострая токсичность на мышах; эффективность при метаболическом синдроме, индуцированном высокоуглеводным рационом у мышей; антиоксидантная активность и гепатопротекторный эффект при CCl_4-индуцированной гепатотоксичности у мышей).

Методы исследования. В данной диссертационной работе применялись спектрофотометрические методы определения общего содержания флавоноидов и фенольных кислот; методика высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием для идентификации полифенольного состава; методика теста DPPH и FRAP для оценки антиоксидантного потенциала; методика MTT-теста для оценки жизнеспособности мононуклеарных клеток периферической крови; методика двукратных серийных разведений для оценки антимикробной активности; гематологические, биохимические, гистологические, морфометрические и статистические методы.

Научная новизна исследования:

1. Впервые методом CO_2-экстракции, обеспечивающий быстрое и щадящее извлечение биологически активных веществ, был получен фитопрепарат из корня *Arctium tomentosum* Mill., определено общее количество флавоноидов и фенольных кислот и идентифицирован полифенольный состав исследуемого фитопрепарата, а также установлена его способность нейтрализовывать свободные радикалы в тестах DPPH и FRAP;

2. Впервые на основании результатов MTT-теста путем оценки жизнеспособности мононуклеарных клеток крови в условиях *in vitro* выявлено отсутствие цитотоксического влияния исследуемого фитопрепарата;

3. Впервые на референс-штаммах грамположительных бактерий *(Staphylococcus aureus),* грамотрицательных бактерий *(Escherichia coli)* и дрожжеподобных грибов *(Candida albicans)* установлена антимикробная активность исследуемого фитопрепарата;

4. Впервые в остром и подостром эксперименте на мышах с применением комплексной оценки массы тела и органометрических показателей, гематологических и биохимических параметров крови и морфологического анализа гистоструктуры внутренних органов, доказана безопасность исследуемого фитопрепарата;

5. Впервые на модели метаболического синдрома, индуцированного высокоуглеводным рационом, с использованием комплексного подхода, включающего оценку массы тела и органометрических показателей, анализ биохимических параметров сыворотки крови, а также морфологическое исследование гистоструктуры внутренних органов мышей, доказана эффективность исследуемого фитопрепарата и установлено его метаболическое действие;

6. Впервые на модели CCl_4-индуцированной гепатотоксичности на основании комплексной оценки антиоксидантной активности, анализа биохимических показателей сыворотки крови и активности печёночных ферментов, а также морфологического исследования гистоструктуры печени мышей экспериментально подтверждено антиоксидантное и гепатопротекторное действие фитопрепарата из корня *Arctium tomentosum* Mill.

Научно-практическая значимость диссертационной работы заключается в расширении и углублении современных представлений о биологической активности фитопрепарата, полученного методом CO_2-экстракции из корня *Arctium tomentosum* Mill. Впервые результаты комплексной оценки безопасности в условиях *in vitro* и *in vivo,* а также данные об антиоксидантной, антимикробной, метаболической и гепатопротекторной активности создают научно-обоснованную базу для дальнейшей фармакологической характеристики данного фитопрепарата. Полученные экспериментальные данные могут быть использованы при обосновании терапевтических доз и режимов применения, а также при планировании клинических исследований, направленных на оценку перспектив практического использования фитопрепарата в коррекции метаболических и воспалительных нарушений.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Фитопрепарат из корня *Arctium tomentosum* Mill., полученный путем CO_2-экстракции, содержит полифенольные соединения, включая флавоноиды и фенольные кислоты, которые могут обуславливать его антиоксидантный потенциал;
2. Исследуемый фитопрепарат проявляет дозозависимое сохранение жизнеспособности мононуклеарных клеток крови в МТТ-тесте *in vitro*;
3. Установлено, что фитопрепарат обладает антимикробной активностью в отношении грамположительных, грамотрицательных бактерии и дрожжеподобных грибов;
4. Фитопрепарат является безопасным и не вызывает признаков токсичности при пероральном введении мышам в остром и подостром эксперименте;
5. В условиях экспериментального метаболического синдрома, индуцированного высокоуглеводным рационом, фитопрепарат проявляет инсулинсенсибилизирующее действие что подтверждается нормализацией уровня глюкозы и инсулина в сыворотке крови и липидкорригирующее действие, что проявляется снижением уровня триглицеридов, общего холестерина и липопротеидов низкой плотности наряду с восстановлением фракции липопротеидов высокой плотности в сыворотке крови у мышей с метаболическим синдромом;
6. На модели CCl_4-гепатотоксичности фитопрепарат оказывает гепатопротекторный эффект, что подтверждается снижением интенсивности окислительного стресса, нормализацией активности маркерных ферментов печени, предотвращением жировой инфильтрации и сохранением гистоструктуры печени.

Личный вклад соискателя. Автор провела анализ литературных данных по изучаемой проблеме, выполнила все экспериментальные исследования, провела статистическую обработку и анализ результатов. Написание и оформление рукописи диссертации проведено по плану, согласованному с научными руководителями.

Принадлежность к научно-исследовательской программе. Данная диссертационная работа была проведена в рамках программно-целевого грантового финансирования: ИРН AP23484003 «Разработка новых отечественных и экологически безопасных фармакологических субстанций для лечения кожных заболеваний».

Апробация результатов. Результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на следующих международных научных конференциях:

1. “Progress in Science” (Brussels, Belgium, December 15-16, 2022);
2. “Modern Trends in Sustainable Development of Biological Sciences” (Almaty, Kazakhstan, March 27-28, 2024).

Публикации. Основные результаты диссертационной работы были опубликованы в 6-ти научных трудах: 3 статьи в базе данных Scopus (Q3, SJR – 0.296, процентиль – 52; Q3, SJR – 0.596, процентиль – 45; Q1, SJR – 0.865, процентиль – 87), 1 статья в журнале рекомендованном КОКСОНВО, 2 тезиса в сборниках международной конференции (Q4, SJR – 0.205, процентиль – 26).

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, заключения, списка использованных источников. Работа изложена на 100 страницах печатного текста, содержит 15 таблиц, 21 рисунка, 224 использованных источников и 7 приложений.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность за внимательное и конструктивное руководство, ценные консультации и советы при выполнении работы отечественному консультанту доктору биологических наук, профессору Шалахметовой Тамаре Минажевне; зарубежному консультанту, доктору ветеринарных наук, профессору Богдану Севастре и заведующему лаборатории фармакологии и токсикологии кандидату биологических наук Ибрагимовой Наиле Ахтамовне.

Практическая база. Исследование было проведено на базе лаборатории фармакологии и токсикологии, АО «Научный центр противоинфекционных препаратов», (Алматы, Казахстан); кафедры биоразнообразия и биоресурсов КазНУ им. аль-Фараби (Алматы, Казахстан); кафедры патофизиологии, Университета сельскохозяйственных наук и ветеринарной медицины (Клуж-Напока, Румыния); факультета фармации Университета медицины и фармации имени Юлиу Хатиегану (Клуж-Напока, Румыния).