Казахский Национальный Университет им. аль-Фараби

УДК 582.9:615.3 (043)

На правах рукописи

АЙТЫНОВА АРАЙЛЫМ ЕЛДОСҚЫЗЫ

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

8D05101 – Биология

Диссертация на соискание ученой степени доктора философии (PhD)

Отечественный научный консультант:
д.б.н., профессор кафедры зоологии,
гистологии и цитологии
Шалахметова Тамара Минажевна

Зарубежный научный консультант:
PhD, профессор кафедры
патофизиологии,
Университета сельскохозяйственных
наук и ветеринарной медицины
Богдан Севастре

Республика Казахстан
Алматы, 2026

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ…… 4
ОПРЕДЕЛЕНИЯ…….. 5
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ…….. 6
ВВЕДЕНИЕ……..... 8
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ……... 14
1.1 Лекарственные препараты растительного происхождения и их биологическая активность…… 14
1.2 Полифункциональная роль печени в метаболическом гомеостазе, биотрансформации ксенобиотиков и регуляции иммунитета…….. 16
1.3 Хемосистематический анализ и биологический потенциал растений рода *Arctium*..... 18
1.4 Сравнительный анализ методов экстракции биологически активных соединений…….. 20
1.4.1 CO_2-экстракция как метод получения биологически активных соединений……... 22
1.5 Планирование исследования биологической активности фитопрепаратов……... 25
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ……... 28
2.1 Объекты исследований……... 28
2.2 Получение фитопрепарата методом CO_2-экстракции…….. 29
2.3 Методы определения содержания биологически активных соединений в составе фитопрепарата и оценки его антиоксидантого потенциала…… 29
2.3.1 Методика определения общего содержания флавоноидов (TFC)... 29
2.3.2 Методика определения общего содержания фенольных кислот (TPA)……. 30
2.3.3 Методика идентификации полифенольного состава…… 30
2.3.4 Методика оценки антирадикальной активности фитопрепарата в тесте DPPH…… 31
2.3.5 Методика оценки восстановительной способности фитопрепарата в тесте FRAP…….. 31
2.4 Методы изучения биологической активности фитопрепарата *in vitro*……... 32
2.4.1 Методика изучения цитотоксического влияния фитопрепарата…. 32
2.4.2 Методика изучения антимикробной активности фитопрепарата 34
2.5 Методы исследования биологической активности фитопрепарата *in vivo*…… 35
2.5.1 Методы исследования безопасности фитопрепарата……... 36
2.5.1.1 Методика исследования острой токсичности фитопрепарата……. 36
2.5.1.2 Методика исследования подострой токсичности фитопрепарата... 37
2.5.2 Методы исследования эффективности фитопрепарата..…….. 39

2.5.2.1 Модель метаболического синдрома…….. 39
2.5.2.2 Модель CCl_4-гепатотоксичности……... 40
2.6 Методика статистического анализа……... 41
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ……. 43
3.1 Фитохимическая характеристика и оценка антиоксидантного потенциала фитопрепарата из корня *Arctium tomentosum* Mill……..... 43
3.2 Исследование цитотоксического влияния фитопрепарата…….. 45
3.3 Оценка антимикробной активности фитопрепарата…… 46
3.4 Исследование острой и подострой токсичности фитопрепарата *in vivo*…… 50
3.4.1 Исследование острой токсичности фитопрепарата…….. 50
3.4.2 Исследование подострой токсичности фитопрепарата…… 52
3.5 Исследование эффективности фитопрепарата при метаболическом синдроме…….. 64
3.6 Исследование эффективности фитопрепарата при CCl_4-гепатотоксичности…….. 72
ЗАКЛЮЧЕНИЕ……... 83
СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ……. 85
ПРИЛОЖЕНИЕ А……... 101
ПРИЛОЖЕНИЕ Б……... 104
ПРИЛОЖЕНИЕ В……... 106
ПРИЛОЖЕНИЕ Г……... 107
ПРИЛОЖЕНИЕ Д……... 113
ПРИЛОЖЕНИЕ Е……... 114
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж…….. 115

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 12 ноября 2020 года № ҚР ДСМ-190/2020 «Об утверждении правил проведения доклинических (неклинических) исследований».

СТ РК ISO 10993-2-2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными. – Введ. 2012–07–01. – Астана: Госстандарт Республики Казахстан, 2011. – 18 с.

Руководство ARRIVE 2.0: обновленные рекомендации по отчетности об исследованиях на животных.

ГОСТ 8050-85. Двуокись углерода газообразная и жидкая. Технические условия: межгосударственный стандарт: издание официальное: утвержден и введен в действие Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 25.03.85 № 795: переиздание с изменениями № 1, 2. – Москва: Стандартинформ, 2006. – 18 с.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации использовались следующие термины с соответствующими определениями:

DPPH – метод, основанный на восстановлении радикала DPPH.

FRAP – метод, основанный на восстановлении ионов железа.

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием.

МТТ-тест – тетразолиевый тест для определения жизнеспособности мононуклеарных клеток периферической крови.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) – стандарты для оценки антимикробной активности.

Стоковый раствор – высококонцентрированный раствор вещества для разведения до рабочих концентраций.

Стоковый микробный инокулянт – концентрированная суспензия жизнеспособных микроорганизмов для серийных разведений.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals – руководство по проведению токсикологических исследований.

Однофакторный дисперсионный анализ – метод статистического анализа для сравнения средних значений одного показателя между двумя или более независимыми группами.

Двухфакторный дисперсионный анализ – метод статистического анализа для оценки влияния двух факторов на один показатель и их взаимодействия.

Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями – метод статистического анализа для оценки влияния двух факторов на один показатель, когда один из факторов измеряется повторно.

Тест Даннетта – постхоковый статистический метод, используемый после anova для межгруппового сравнения.

Тест Бонферрони – постхоковый статистический метод, применяемый после anova для внутригруппового сравнению.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

Фитопрепарат (ФТ)	–	CO_2-экстракт из корня *Arctium tomentosum* Mill.
Arctium L.	–	Род Лопух
Arctium tomentosum Mill.	–	Вид Лопух войлочный
Arctium lappa L.	–	Лопух большой
Asteraceae	–	Сложноцветные
Candida albicans	–	Кандида альбиканс
Streptococcus aureus	–	Золотистый стафилококк
Escherichia coli	–	Кишечная палочка
ВОЗ	–	Всемирная Организация Здравоохранения
МАЖБ	–	Метаболически ассоциированная жировая болезнь печени
АФК	–	Активные формы кислорода
БОФ	–	Белки острой фазы
TFC	–	Общее содержание флавоноидов
мг ЭР/мл	–	Миллиграмм эквивалента рутина на 1 мл
TPA	–	Общее содержание фенольных кислот
мг ЭКК/мл	–	Миллиграмм эквивалента кофейной кислоты на 1 мл
мкмоль ЭТ/мл	–	Микромоль эквивалента тролокса на 1 мл
IC_{50}	–	Полумаксимальная ингибиторная концентрация
МБК	–	Минимальная бактерицидная концентрация
МФК	–	Минимальная фунгицидная концентрация
МИК	–	Минимальная ингибирующая концентрация
КОЕ	–	Колониеобразующие единицы
ДМСО	–	Диметилсульфоксид
LD_{50}	–	Средняя летальная доза
RBC	–	Эритроциты
Hb	–	Гемоглобин
Hct	–	Гематокрит
MCV	–	Средний объем эритроцита
MCH	–	Среднее количество гемоглобина в эритроците
MCHC	–	Средняя концентрация гемоглобина в эритроците
WBC	–	Лейкоциты
PLT	–	Тромбоциты
LYM	–	Лимфоциты
MON	–	Моноциты
GRA	–	Гранулоциты
АЛТ	–	Аланинаминотрансфераза
АСТ	–	Аспартатаминотрансфераза
ГГТ	–	Гамма-глутамилтранспептидаза

ОБ	–	Общий белок
МДА	–	Малоновый диальдегид
КАТ	–	Каталаза
СОД	–	Супероксиддисмутаза
ГП	–	Глутатион пероксидаза
ОХ	–	Общий холестерин
ТГ	–	Триглицериды
ЛПВП	–	Липопротеины высокой плотности
ЛПНП	–	Липопротеины низкой плотности
МС	–	Метаболический синдром
HOMA-IR	–	Индекс инсулинорезистентности
CCl_4	–	Тетрахлорид углерода
г	–	грамм
мг	–	миллиграмм
пг	–	пикограмм
мкг	–	микрограмм
ммоль	–	миллимоль
мкмоль	–	микромоль
н	–	нормаль
л	–	литр
мл	–	милилитр
мкл	–	микролитр
мин	–	минута
мм	–	миллиметр
нмоль	–	наномоль
фл	–	фемтолитр
МЕ	–	международная единица

ВВЕДЕНИЕ

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 являются основным ресурсом для производства фитопрепаратов [1, 2]. Одним из широко используемых источников растительного сырья является представитель семейства *Asteraceae* (Сложноцветные) – *Arctium lappa* L. (Лопух большой), корень которого традиционно используется в форме экстрактов для коррекции дерматологических [3, 4], гастроэнтерологических [5, 6] и гепатобилиарных нарушений [7, 8]. 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) [9, 10]. Данный комплекс соединений определяет широкий спектр фармакологической эффективности растения, включая антиоксидантный, противовоспалительный, гепатопротекторный, противоопухолевый и антибактериальный эффекты [11-13].

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 [14, 15]. 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 [16, 17].

Рост заболеваемости печени обусловлен мультифакторной этиологией: от токсических гепатопатий до метаболически ассоциированной жировой болезни печени (МАЖБП) [18]. Печеночная дисфункция в сочетании с нарушениями углеводного и липидного обмена инициирует каскад системных реакций: гипергликемию, дислипидемию и инсулинорезистентность, что формирует замкнутый цикл метаболических расстройств [19]. Эти процессы тесно коррелируют с риском развития сахарного диабета 2 типа и сердечно-сосудистых осложнений [20]. На органном уровне накопление триглицеридов и активация перекисного окисления липидов приводят к трансформации стеатоза в стеатогепатит [21]. В отсутствие адекватной фармакотерапии хроническое воспаление стимулирует фиброгенез, при котором функциональная ткань замещается соединительной, что неизбежно прогрессирует в цирроз [22, 23].

Несмотря на широкое применение классических растительных гепатопротекторов, в частности на основе силимарина [24], цинарина [25], глицирризинов [26] и куркумина [27], 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 [28, 29]) или псевдогиперальдостеронизм (у глицирризинов [30]) – в сочетании с высокой ресурсозависимостью производства и отсутствием локальной сырьевой базы для ряда интродуцированных видов [31], определяют необходимость расширения арсенала препаратов политропного действия на основе доступного отечественного растительного сырья.

В этом контексте предполагается, что *A. tomentosum*, обладая специфическим хемотаксономическим профилем, может рассматриваться как перспективный источник биологически активных соединений с комплексным механизмом действия [32, 33]. Обоснованием для изучения данного вида выступает гипотеза о высокой фармакологической ценности липофильного комплекса, извлекаемого методом субкритической CO_2-экстракции [34]. Предполагается, что содержание фенольных соединений (фенолкарбоновых кислот и флавоноидных гликозидов) в составе полученнного экстракта предопределят его биологический потенциал [35]. 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 [36].

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) [37, 38]. Данный подход относится к категории «зеленых» технологий, поскольку исключает стадию термического упаривания, обеспечивая экологическую безопасность процесса и нативную сохранность термолабильных биологически активных веществ [39]. Полная декомпрессия газа на финальном этапе экстракции гарантирует отсутствие следовых количеств экстрагента в конечном продукте, что обусловливает его чистоту и экологическую безопасность [40, 41].

Резюмируя вышеизложенное, выбор *A. tomentosum* в качестве объекта исследования обоснован 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 соединений, идентифицировать полифенольный состав фитопрепарата, полученного методом CO_2-экстракции из корня *Arctium tomentosum* Mill., и оценить его антиоксидантный потенциал в тестах 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 соединений, полифенольный состав исследуемого фитопрепарата и его антирадикальная активность; биологическая активность фитопрепарата *in vitro* (антимикробная активность в отношении вышеуказанных референс-штаммов микроорганизмов и цитотоксическое влияние 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 соединений; методика высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием для идентификации полифенольного состава; методика теста DPPH и FRAP для оценки антиоксидантного потенциала; методика МТТ-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, обеспечивающим извлечение нативного комплекса биологически активных соединений, был получен фитопрепарат из корня *Arctium tomentosum* Mill., определено общее содержание флавоноидов и фенольных соединений, и идентифицирован полифенольный состав исследуемого фитопрепарата, а также установлен его антиоксидантный потенциал в тестах DPPH и FRAP;
2. Впервые на основании результатов МТТ-теста путем оценки жизнеспособности мононуклеарных клеток периферической 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 дальнейшего фармакологического исследования данного фитопрепарата. Полученные экспериментальные результаты могут быть использованы при обосновании терапевтических доз и режимов применения, а также при планировании клинических исследований, для оценки перспективы практического применения исследуемого фитопрепарата при коррекции метаболических и воспалительных нарушений.

Результаты проведенных исследований были внедрены в учебный процесс на кафедре зоологиии, гистологии и цитологии, факультета биологии и биотехнологии КазНУ им. Аль-Фараби по дисциплинам «Биология клетки и гистология» 2-го курса бакалавриата и «Патология клеток и тканей» 4-го курса бакалавриата по образовательной программе «6В05102 – Биология» (Приложение А).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Фитопрепарат из корня *Arctium tomentosum* Mill., полученный путем CO_2-экстракции, содержит полифенолы, включая флавоноиды и фенольные соединения, 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 – 54; Q3, SJR – 0.596, процентиль – 54; Q1, SJR – 0.865, процентиль – 87), 1 статья в журнале рекомендованном КОКСОНВО, 2 тезиса в сборниках международной конференции (Q3, SJR – 0.205, процентиль – 44).

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 зоологии, гистологии и цитологии 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).

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Лекарственные препараты растительного происхождения и их биологическая активность

Растительные фитопрепараты занимают устойчивое место в современной фармакологии как источники биологически активных соединений (БАС), обладающих широким спектром биологической активности [42]. Их значимость определяется не только высоким содержанием различных классов вторичных метаболитов, таких как флавоноиды, фенольные кислоты, терпеноиды, лигнаны, полисахариды и жирные кислоты, а также нативностью химической структуры в полученных растительных экстрактах, обеспечивающего синергизм в их терапевтическом действии [43]. В совокупности данные соединения формируют фитопрепарат, биологическая активность которого обусловлена как суммой отдельных эффектов, так и их функциональным взаимодействием и системной модуляцией биологических процессов [44].

Современные исследования в области фитофармакологии показывают, что растительные экстракты обладают мультитаргетным действием, что особенно важно в контексте метаболических нарушений, окислительного стресса, и связанных с ними воспалительных процессов и хронических заболеваний [45]. В частности, полифенольные соединения демонстрируют способность одновременно воздействовать на несколько сигнальных каскадов, включая регуляцию окислительного стресса, воспалительных медиаторов и ферментных систем антиоксидантной защиты, что обуславливает широкий спектр их биологической активности [46, 47]. Эффективность применения фитопрепаратов может быть определена как фитохимическим профилем исходного растительного сырья, так и технологией получения экстракта из него. Следовательно, выбор методики экстракции может повлиять на итоговое соотношением вторичных метаболитов и степенью их сохранности в полученном продукте [48].

В международной регуляторной практике, включая подходы ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) и рекомендации OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) по оценке безопасности новых лекарственных препаратов подчёркивается важность стандартизации состава растительных экстрактов, а также воспроизводимости их биологической активности как ключевого критерия доклинической оценки. Под ICH общепринята международная система требований к разработке лекарственных препаратов, среди которых документы серии Q8-Q11 регламентируют контроль их состава [49]. В свою очередь, в рамках OECD были разработаны руководства по проведению токсикологических испытаний, широко применяемые при доклинической оценке безопасности лекарственных препаратов как химического, так и растительного происхождения [50]. В рамках национального регулирования Республики Казахстан данные подходы соответствуют положениям Закона РК «О лекарственных средствах и медицинских изделиях»,

а также Правил проведения доклинических исследований и клинических испытаний лекарственных средств, утверждённых уполномоченным органом здравоохранения, что обеспечивает согласованность национальных требований с международными стандартами [51]. В нынешней практике разработки фитопрепаратов значительная часть коммерчески доступных растительных средств основана на стандартизированных экстрактах, полученных из культивируемых или традиционно используемых видов лекарственных растений. Это обеспечивает контроль и воспроизводимость состава, стабильность фармакологического эффекта и соответствие регуляторным требованиям по контролю качества и стандартизации лекарственных средств.

В перечень стандартизованных фитопрепаратов включены экстракты расторопши пятнистой (*Silybum marianum*) [52], гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba*) [53], эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea*) [54], а также зверобоя пронзенного (*Hypericum perforatum*) [55], валерианы лекарственной (*Valeriana officinalis*) [56], женьшеня (*Panax ginseng*) [57] и конского каштана (*Aesculus hippocastanum*) [58]. Для данных препаратов разработаны регламентированные промышленные технологии, обеспечивающие строго выверенный профиль биологически активных веществ. Фармакологическая эффективность вышеперечисленных продуктов обусловлена содержанием специфических вторичных метаболитов: флаволигнанов, обеспечивающих гепатопротекторный эффект и регенерацию гепатоцитов [59-61]; терпеновых лактонов, улучшающих микроциркуляцию и защищающих нейроны от гипоксии [62]; и полифенольных соединений, обладающих выраженными антиоксидантными свойствами [63]. Терапевтический профиль дополняют гиперицин, проявляющий антидепрессивную активность за счет ингибирования обратного захвата нейромедиаторов и модуляции работы рецепторов [64]. Валереновые кислоты, оказывают седативное и анксиолитическое действие через GABA-эргическую систему, что способствует снижению психоэмоционального напряжения и нормализации сна [65]. Также профиль включает адаптогенные гинзенозиды, повышающие общую резистентность организма к стрессу, и венотонизирующий эсцин, который укрепляет сосудистую стенку и эффективно снижает проницаемость капилляров [66].

В контексте коррекции висцеральных патологий особое внимание сосредоточено на лекарственных средствах растительного происхождения обеспечивающих протекцию паренхиматозных органов [67]. К примеру, пепараты на основе силимарина – экстрака из *Silybum marianum* рассматриваются как один из наиболее изученных фитогепатопротекторов, обладающих доказанной антиоксидантной, мембраностабилизирующей и антифибротической активностью [68]. Благодаря способности модулировать метаболические процессы внутри гепатоцитов, экстракты расторопши широко применяются при метаболических, токсических и лекарственно-индуцированных поражениях печени [69]. Высокая востребованность фитопрепаратов гепатопротекторного типа подчеркивает уязвимость печени из-за ее функциональной нагрузки, следовательно, анализ механизмов защиты

гепатоцитов требует рассмотрения данного органа как центрального звена системной регуляции гомеостаза [70].

1.2 Полифункциональная роль печени в метаболическом гомеостазе, биотрансформации ксенобиотиков и регуляции иммунитета

Печень является многофункциональным органом, принимающим участие как в процессах метаболизма, так и в поддержке гомеостаза. Данный орган принимает участие в углеводном, липидном и белковом обмене благодаря своей ферментативной и синтетической функциям. Также печень выступает главным барьером на пути веществ поступающих извне: будь то жизненно необходимые макронутриенты, поступающие вместе с пищей или экзогенные ксенобиотики, биотрансформация и детоксикация которых является обязательным этапом. Наряду с метаболической активностью, печень принимает непосредственное участие в иммуной реакции организма, что реализуется как через клеточные механизмы, так и через белковосинтетическую функцию гепатоцитов [71].

Регуляция метаболизма гепатоцитами служит фундаментальной основой системного гомеостаза, обеспечивая постоянство внутренней среды организма. В рамках углеводного обмена печень выполняет роль ключевого глюкостата: депонируя избыток глюкозы в виде гликогена в постпрандиальный период и активируя процессы гликогенолиза и глюконеогенеза при дефиците нутриентов в рационе, она поддерживает стабильный уровень глюкозы в крови. Липидный метаболизм в печени тесно сопряжен с углеводным и включает в себя процессы синтеза триглицеридов, фосфолипидов и холестерина, а также сборку и секрецию липопротеинов низкой и высокой плотности [72]. Регуляторные сбои на данном мегаболическом уровне – будь то под воздействием несбалансированного рациона питания или гепатотоксичных соединениий – приводят к патологическим процессам: от внутриклеточного накопления липидов (стеатоза) до системных проявлений метаболического синдрома и токсического поражения печени.

В условиях длительного дисбаланса макронутриентов в рационе происходит нарушение функциональности печени, что служит началом развития метаболического синдрома. Избыточное поступление субстрата при высокоуглеводной диете, в частности избыток фруктозы и сахарозы, приводит к ускоренному синтезу свободных жирных кислот. Свободные жирные кислоты в свою очередь индуцируют гиперактивацию путей *de novo* липогенеза в гепатоцитах [73]. На фоне данного процесса длительный избыток углеводов приводит формированию инсулинорезистентности, при которой нарушается способность гепатоцитов утилизировать глюкозу из системного кровотока, что ведет к гипергликемии. Хроническая гипергликемия является основой внутрипеченочной гипертриглицеридемии: избыток циркулирующей глюкозы активирует транскрипционные факторы (в частности, ChREBP и SREBP-1c), которые индуцируют экспрессию ферментов липогенеза, замыкая круг метаболических нарушений [74]. Патологическая кумуляция триглицеридов в цитоплазме гепатоцитов инициирует липотоксичность, запускающий стресс

эндоплазматического ретикулума и митохондриальную дисфункцию. Как следствие развивается метаболически ассоциированная жировая болезнь печени (МАЖБП), что является предпосылкой для угнетения функциональной активности печени, в том числе в процессах метаболизма макронутриентов, синтеза белков плазмы, биотрансформации ксенобиотиков и детоксикации организма [75].

Гепатоциты представляют собой одну из наиболее метаболически нагруженных клеточных популяций организма. Помимо описанных выше функций, печень играет ключевую роль в поддержании системного и локального окислительного-восстановительного гомеостаза [76]. Интенсивное функционирование гепатоцитов сопряжено с перманентным воздействием реактивных метаболитов и активных форм кислорода (АФК), генерируемых как в процессах физиологического метаболизма, так и при детоксикации экзогенных субстанций. Данный фактор обусловливает высокую уязвимость гепатоцитов к окислительному стрессу и последующему токсическому повреждению печени [77].

Гепатобилиарная система характеризуется высокой активностью микросомальной системы цитохрома Р450. В данном мультиферментном комплексе изоформа CYP2E1 играет ключевую роль в биотрансформации липофильных соединений, включая этанол, промышленные экотоксиканты и ксенобиотики лекарственного происхождения [78]. Данный процесс, несмотря на свою физиологическую значимость, может стать причиной частичного разобщения монооксигеназных реакций, индуцирующим «утечку» электронов с последующей гиперпродукцией АФК. Генерируемые реактивные метаболиты инициируют перекисное окисление липидов (ПОЛ) билипидных мембран и вызывают повреждение митохондриального аппарата, что приводит к нарушению биоэнергетических процессов в клетках и как следствие к разрушению самих гепатоцитов. Данный каскад молекулярных реакции завершается транслокацией транскрипционного фактора NF-κB в клеточное ядро и последующей активацией провоспалительного сигнального пути, что приводит к экспрессии ключевых цитокинов (ФНО-α, ИЛ-1, ИЛ-6) и паракринной активации резидентных макрофагов (клеток Купфера), что в совокупности приводит к воспалительно-клеточной инфильтрации печеночной ткани [79].

Описанные патофизиологические реакции определяют центральную роль печени в патогенезе системных заболеваний, включая метаболически ассоциированную жировую болезнь (МАЖБП) и токсическое поражение поражение печени. В последние десятилетия отмечается стабильный рост распространенности данных нозологических форм. При этом ведущее значение приобретает МАЖБП, патогенетически сопряженная с развитием инсулинорезистентности и дислипидемии в результате нарушений углеводного и липидного обменов. Учитывая высокий потенциал трансформации хронического стеатоза в стеатогепатит, фиброз и цирроз, данная патология является одной из важнейших проблем клинической гепатологии [80].

В данном контексте критическое значение приобретает разработка гепатопротекторных препаратов, обладающих мультифункциональным действием: способностью восстанавливать функциональность гепатоцитов, нормализовывать метаболизм макронутриентов, стабилизировать билипидные мембраны гепатоцитов, снижать интенсивность окислительного стресса и модулировать воспалительную реакцию [81]. Несмотря на применение в клинической практике ряда стандартизированных фитопрепаратов гепатопротекторного типа, их терапевтическая эффективность характеризуется монотаргетным характером действия, нацеленных на коррекцию лишь одного звена патогенеза [82]. В то же время полифункциональная роль печени и многокомпонентность её повреждения как при метаболическом синдроме, так и при ксенобиотической интоксикации требуют комплексного, мультитаргетного фармакологического эффекта, способного одновременно модулировать углеводный и липидный обмены, окислительно-восстановительный баланс и синтетические процессы в гепатоцитах [83]. В связи с этим актуальным вектором исследования является скрининг источников биологически активных соединений, обладающих мультифункциональным терапевтическим потенциалом для синергического усиления существующих схем защиты печени.

1.3 Хемосистематический анализ и биологический потенциал растений рода *Arctium*

Растительное сырье традиционно представляет собой фундаментальную основу для получения биологически активных метаболитов, востребованных в клинической практике. Фармакотерапевтический потенциал лекарственных растений, верифицированный как этноботаническими сведениями, так и результатами современных скрининговых исследований, определяет их детерминирующую роль в профилактике и комплексной терапии мультифакторных патологий [84]. Согласно экспертным оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), значительная часть мировой популяции по сей день применяет растительные экстракты в целях первичной медицинской помощи, что подтверждает стабильную социально-экономическую и медицинскую значимость разработки фитопрепаратов [85].

С позиции современной фармакогнозии экстракт из растительного сырья представляет собой комплекс нативных биологически активных веществ [86]. В данном контексте в качестве перспективных источников сырья рассматриваются дикорастущие и рудеральные таксоны, характеризующиеся высокой экологической пластичностью, протяженным ареалом и стабильной воспроизводимостью биомассы. Указанные свойства гарантируют получение растительного сырья со стандартизованным профилем БАС, что критически значимо для развития регионального фармацевтического сектора и реализации программ импортозамещения лекарственных средств.

Современная фармакогнозия направлена в сторону системного анализа метаболома определенного вида растения с изучением его полного фитохимического профиля. Биологическая активность извлекаемых экстрактов

может быть детерминирована синергическим эффектом различных классов вторичных метаболитов – фенолкарбоновых кислот, флавоноидов, лигнанов, терпеноидов и полисахаридов, демонстрирующих мультитаргетный механизм действия на молекулярном, клеточном и тканном уровнях. В этой связи немаловажное значение приобретает хемосистематика растении, позволяющая верифицировать сопряженность таксономической характеристики растения с его количественным и качественным составом полифенольных метаболитов [87]. Установлено, что представители одного ботанического рода могут характеризоваться филогенетически обусловленным сходством спектров вторичных метаболитов, тогда как внутриродовые количественные и качественные вариации могут определить специфичность и выраженность биологической активности [88].

Семейство *Asteraceae* (Сложноцветные) объединяет множество видов растений с подтвержденным лечебным потенциалом [89]. Филогенетически обусловленный фитохимический профиль представителей данного семейства характеризуется выраженным разнообразием вторичных метаболитов, среди которых полифенольные соединения и их конъюгаты определяют антиоксидантную и мембраностабилизирующую активности [90, 91].

Род *Arctium* (Лопух) занимает особое положение в хемосистематике семейства *Asteraceae,* что обусловлено специфическим профилем вторичных метаболитов, представленным лигнанами, фенолкарбоновыми кислотами и флавоноидами [92]. В качестве референтного и наиболее изученного таксона выступает *Arctium lappa* L. (Лопух большой), хемотаксономическим маркером которого служит лигнан арктиин [93, 94].

Современные скрининговые данные свидетельствуют, что терапевтический потенциал представителей рода *Arctium* детерминирован не только лигнановым комплексом, но и фракцией полифенольных соединений с выраженными антиоксидантными и противовоспалительными свойствами [95]. С точки зрения нативного комплекса БАС, поливалентная биологическая активность извлекаемых экстрактов может быть реализована по принципу многокомпонентного синергизма, где суммарный состав БАС может определить биологическую активность и фармакологическую эффективность [96].

Вид *Arctium tomentosum* Mill. (Лопух войлочный) является одним из малоизученных, но широко распространенным представителем рода *Arctium*. Несмотря на выраженное морфологическое сходство с *A. lappa*, имеются данные о различиях качественного и количественного состава вторичных метаболитов, способной модулировать выраженность их биологической активности. Фитохимическая изученность и данные о биологической активности вида *A. tomentosum* остаются фрагментарными, что исключает прямую экстраполяцию результатов, полученных для других более изученных представителей рода *Arctium* [97]. Применение аналитических методов, в частности спектфотометрического определения общего содержания флавоноидов и фенольных кислот, высокоэффективной жидкостной хроматографии, позволит изучить фитохимический состав *A. tomentosum* [98], что немаловажно при

исследовании данного вида. В этой связи исследование биологической активности экстракта, полученного из растительного сырья малоизученного вида *A. tomentosum* представляет научный интерес для расширения как для хемосистематической характеристики рода *Arctium*, так и для изучения альтернативных источников БАС. Данный подход также соответствует стандартам разработки новых лекарственных препаратов растительного происхождения, регламентирующих валидирование и воспроизводимость фитохимического состава, стандартизацию исходного растительного сырья и выход целевых вторичных метаболитов. Это создает научно-теоретическое, методологическое и практическое обоснования для подтверждения биологической активности полученного экстракта на общепринятых экспериментальных моделях.

1.4 Сравнительный анализ методов экстракции биологически активных соединений

Эффективность извлечения биологически активных соединений (БАС) из растительного сырья определяется совокупностью факторов, включающих химическую природу целевых метаболитов, структуру растительной матрицы, а также выбранную технологию экстракции. В зависимости от используемого подхода существенно варьируются как количественный выход соединений, так и их качественный состав, что напрямую влияет на биологическую активность конечного экстракта. В связи с этим выбор метода экстракции является одним из ключевых этапов в фитохимических и фармакогностических исследованиях [99].

К числу наиболее распространенных методов экстракции относятся мацерация, перколяция, получение водных отваров и экстракция в аппарате Сокслета, основанные на применении полярных растворителей (воды, этанола и водно-спиртовых смесей). По температурному режиму данные методы можно классифицировать на экстракцию в условиях комнатной температуры и экстракцию с применением нагревания экстрагента [100].

Среди классических способов экстракции без термической обработки – базовым и наиболее технологически доступным решением является метод мацерации. Мацерация представляет собой процесс длительного настаивания растительного сырья в водной или водно-спиртовой среде в температурном диапазоне от 15 до 25 °C (при комнатной температуре) либо от 40 до 60 °C (при мацерации с подогревом). Данный метод обеспечивает извлечение преимущественно полярных соединений, включая фенольные кислоты, флавоноиды и полисахариды, однако характеризуется значительной продолжительностью процесса, составляющей от 3 до 7 суток, а также ограниченной селективностью. Кроме того, сопутствующее извлечение высокомолекулярных балластных веществ может усложнять последующую стандартизацию полученного экстракта и интерпретацию его биологической активности [101].

Экстракция в аппарате Сокслета обеспечивает исчерпывающее извлечение биологически активных веществ за счёт многократной циркуляции экстрагента

через слои растительного сырья. Данный процесс протекает при постоянном термическом режиме, соответствующем точке кипения выбранного растворителя (в диапазоне от 55 до 100 °С). Несмотря на высокую эффективность по выходу целевых метаболитов, данный метод сопряжен с пролонгированным температурным воздействием на растительную матрицу в течение 6-24 часов, что приводит к частичной деградации термолабильных соединений. Более того данный метод может сопровождаться нежелательными окислительными реакциями, характерными для липофильных растительных компонентов. Для представителей рода *Arctium*, содержащих комплекс флавоноидных, фенольных и лигнановых соединений, такие условия экстракции могут приводить могут приводить к деградации БАС и искажению нативного фитохимического профиля [102].

С целью повышения эффективности извлечения БАС и сокращения продолжительности процесса в последние десятилетия активно развиваются инновационные методы, основанные на применении физических факторов воздействия. Данные подходы относятся к методам «зелёной химии» и нацелены на снижение энергетических затрат, минимальное применение органических растворителей и повышение экологической безопасности процессов экстракции [103].

Среди альтернативных методов ультразвуковая экстракция при низкочастотном диапазоне от 20 до 100 кГц обеспечивает эффективное извлечение метаболитов. Преимуществом данного метода является возможность сокращения длительности экстрагирования до 15-60 минут при условиях умеренного температурного режимеа (30-50 °С), что минимизирует риск термической деградации БАС. Однако чрезмерно интенсивное акустическое воздействие или пролонгированная локальная экспозиция могут приводить к частичной деструкции высокомолекулярных соединений и генерации свободных радикалов в экстрагенте [104].

Другим перспективным инновационным методом извлечения БАС выступает микроволновая экстракция. Данный метод использует энергию электромагнитного излучения для быстрого нагрева внутриклеточной влаги, что приводит к повышению давления внутри растительной клетки, разрушению клеточной стенки и мгновенному выходу целевых метаболитов в экстрагент. Данный метод отличается значительно высокой скоростью экстракции (от 1 до 15 минут) и эффективностью извлечения БАС. Однако данный метод требует тщательного контроля режимов температуры и мощности, поскольку локальный перегрев может приводить к деградации термочувствительных БАС, что приведет к изменению нативного профиля вторичных метаболитов растительного сырья [105].

Ферментативная экстракция представляет собой высокоселективный «щадящий» метод, основанный на использовании гидролитических ферментов (целлюлаз, пектиназ и гемицеллюлаз), избирательно расщепляющих полисахаридные компоненты клеточной стенки. Специфика биокатализа позволяет проводить процесс при умеренной температуре (35-50 °С) и в

тщательно контролируемом pH (4.0-6.0), что позволяет снизить риск разрушения лабильных БАС. Преимуществом данного метода является максимальная сохранность нативной структуры БАС, однако применение ферментативной экстракции сопровождается повышенной стоимостью гидролитических ферментов и необходимостью тщательного контроля условий реакции (температура, pH, время инкубации) [106].

Сравнительный анализ традиционных и современных методов экстракции показывает, что не существует универсального подхода, способного одновременно обеспечить максимальный выход всех классов БАС, при этом сохраняя их нативную структуру. Эффективность метода зависит от физико-химических свойств целевых метаболитов, анатомических особенностей растительного сырья и параметрами процесса экстракции, что немаловажно при исследованиях малоизученных видов как *A. tomentosum* [107]. Следовательно, экстракция является не просто технологическим этапом, а этапом обуславливающий качественный состав полученного продукта, что в результате определяет биологическую активность экстракта [108]. Это подтверждает необходимость использования современных технологий, способных гарантировать стабильность фитохимического состава и сохранность нативной структуры целевых метаболитов.

1.4.1 CO_2-экстракция как метод получения биологически активных соединений

В ряду современных методик получения растительных экстрактов особое место занимает экстракция с использованием диоксида углерода в качестве растворителя. Интерес к данному методу обусловлен возможностью проведения процесса экстракции при комнатной температуре и умеренном давлении, что гарантирует сохранность лабильных БАС из растительного сырья. В отличие от традиционных органических растворителей, субкритический диоксид углерода химически инертен и нетоксичен, что гарантирует экологическую безопасность полученного экстракта. Более того, после завершения процесса экстрагирования при декомпрессии, диоксид углерода полностью испаряется, что в свою очередь позволяет извлечь чистый и нативный комплекс целевых метаболитов из растительного сырья. Полученный экстракт в итоге не содержит, как и остаточных примесей, так и балластных веществ. Данное преимущество имеет немаловажное значение при разработке растительных лекарственных препаратов, к безопасности, чистоте и воспроизводимости состава которых предъявляются жесткие фармакопейные требования [109].

Одним из ключевых технологических достоинств субкритической CO_2-экстракции является возможность регулирования процесса путем изменения параметров давления и температуры. Варьирование данных условий позволяет управлять растворяющей способностью среды для направленного извлечения целевых БАС. В силу своих физико-химических свойств при субкритических параметрах экстракции жидкий диоксид углерода осуществляет свою функцию неполярного растворителя и демонстрирует высокую эффективность извлечения

как липофильных, так и умеренно полярных компонентов, включая эфирные масла, жирные кислоты, терпены, фитостерины, а также ряд полифенольных соединений [110].

Преимуществом метода CO_2-экстракции является щадящий температурный режим. Отсутствие высоких температур снижает риск деградации термочувствительных БАС, включая полифенолы, витамины и другие лабильные вещества. Кроме того, инертная природа диоксида углерода снижает вероятность окислительных процессов, что способствует сохранению природной структуры и биологической активности целевых метаболитов [111]. Это особенно актуально для растительного сырья, богатого чувствительными к воздействию кислорода и нагревания БАС. Другим немаловажным преимуществом данной методики является высокая проникающая способность диоксида углерода, обеспечивающая эффективное взаимодействие с клеточной структурой растительного сырья. Благодаря низкой вязкости и высокой диффузионной способности, диоксид углерода эффективно проникает в поры растительного материала, способствуя более полному извлечению внутриклеточных компонентов. Это позволяет повысить выход целевых метаболитов по сравнению с рядом традиционных методов [112].

Дополнительным преимуществом является возможность получения экстрактов с низким содержанием сопутствующих балластных веществ. В отличие от водно-спиртовых извлечений, где вместе с целевыми соединениями экстрагируются сахара, белки и высокомолекулярные полисахариды, CO_2-экстракция позволяет формировать более «чистый» профиль, обогащённый низкомолекулярными БАС [113]. Как правило это способствует последующей стандартизации полученного продукта и воспроизводимости его состава, что является немаловажным требованием при разработке фитопрепаратов [114].

Следует также учитывать, что состав получаемых CO_2-экстрактов определяется не только природой исходного сырья, но и параметрами технологического процесса. Изменение давления, температуры, продолжительности экстракции и степени измельчения сырья может существенно влиять на качественный и количественный состав полученного экстракта, что открывает возможности для целенаправленной коррекции фитохимического профиля конечно продукта [115]. Таким образом, CO_2-экстракция может рассматриваться не только как метод извлечения целевых БАС, но и как методика для сохранения нативного химического состава фитопрепарата.

Несмотря на ряд очевидных преимуществ метода CO_2-экстракции, он также имеет и определённые ограничения. В частности, эффективность извлечения полярных соединений, таких как гликозилированные флавоноиды и фенольные кислоты, может быть ниже по сравнению с методиками с применением полярных растворителей [116]. Однако в контексте фармацевтической разработки подобная селективность выступает весомым преимуществом, поскольку она обуславливает направленное фракционирование БАС. Субкритический диоксид углерода обеспечивает концентрирование

целевой липофильной и умеренно полярной фракций (включая лигнаны, стерины, флавоноиды и фенольные кислоты) в нативном виде, исключая попадания сопутствующего гидрофильного пула балластных веществ в полученный экстракт [117]. В связи с этим применение субкритической CO_2-экстракции целесообразно рассматривать как самостоятельный метод получения чистых фитохимических фракций с исходным фитохимическим профилем растительного сырья.

При сравнительнном анализе с ранее описанными методами экстракции, CO_2-экстракция занимает промежуточное положение между традиционными и интенсифицированными методами. С одной стороны, она обеспечивает более щадящие условия по сравнению с термическими методами, такими как экстракция в аппарате Сокслета, с другой – позволяет достичь высокой эффективности извлечения, и при оптимизации параметров процесса экстракции сопоставимой с ультразвуковой и микроволновой методиками. При этом ключевым преимуществом остаётся экологическая безопасность и отсутствие токсичных растворителей, что делает данный метод особенно перспективным для фармацевтических и нутрицевтических применений [118].

Следует, однако, подчеркнуть, что оценка эффективности фитопрепаратов не может основываться исключительно на максимальном выходе экстрагируемых соединений. Современные данные свидетельствуют, что биологическая активность растительных экстрактов определяется не только концентрацией отдельных метаболитов, но и их структурной организацией и синергизмом между БАС полученных фитопрепаратов [119]. Более того, установлено, что их действие зависит от фармакокинетических факторов, включая биодоступность, метаболическую трансформацию и взаимодействие с кишечной микробиотой [120]. В ряде исследований подчёркивается, что комбинированное действие полифенолов может быть более выраженным, чем эффект отдельных соединений, что связано с явлениями синергизма и потенцирования на молекулярном уровне [121]. При этом фитохимический комплекс может рассматриваться как функциональная система, в которой различные БАС воздействуют на взаимосвязанные звенья одного патологического процесса, обеспечивая мультифункциональное биологическое действие Данные особенности принципиально важны при выборе технологии получения фитопрепарата, поскольку агрессивные методы экстракции могут приводить к нарушению нативного соотношения БАС, изменению их химической структуры и искажению функционально значимых взаимодействий между ними. В частности, возможны как деградация отдельных компонентов, так и смещение баланса между различными классами вторичных метаболитов, что потенциально влияет на итоговую биологическую активность полученного экстракта [122].

В данном контексте особую значимость приобретают щадящие методы экстракции, позволяющие сохранить максимально нативный природный профиль вторичных метаболитов, минимизировать термическую и окислительную деградацию, а также обеспечить более воспроизводимый

химический состав фитопрепаратов. Это является важным условием для корректной интерпретации результатов последующих биологических исследований и сопоставимости результатов экспериментальных данных, полученных на разных тест-системах. В этой связи CO_2-экстракция рассматривается как технологически обоснованный подход, позволяющий получить фитопрепарат с сохранённой нативной фитохимической структурой. Благодаря щадящим условиям процесса экстракции и отсутствию полярных растворителей данный метод способствует сохранению соотношения БАС, что особенно важно в контексте синергетического характера действия полифенольных метаболитов. Это создаёт основу для дальнейшей биологической оценки конечног продукта – фитопрепарата, включая исследования его безопасности и эффективности в условиях *in vitro* и *in vivo,* что непосредственно соответствует целям настоящего исследования.

1.5 Планирование исследования биологической активности фитопрепаратов

Согласно принципам экспериментальной фармакологии дизайн исследований биологической активности новых лекарственных препаратов растительного происхождения должно включать в себя фитохимическую характеристику и скрининг биологического потенциала *in vitro,* с последующими исследованиями безопасности и эффективности *in vivo* [123]. Данный подход позволяет обосновать целесообразность исследований биологической эффективности новых препаратов на животных моделях путем предварительной оценки биологического потенциала на *in vitro* тест-системах (клеточные культуры и референс-штаммы микроорганизмов).

Методологическим обоснованием последовательного планирования этапов исследований также является соблюдение международных принципов биоэтики, сформулированных в концепции 3R (Replacement, Reduction, Refinement – замещение, сокращение и гуманизация). Предварительная фитохимическая характеристика и оценка антиоксидантного потенциала фитопрепаратов *in vitro* позволяет заместить (Replacement) использование живых систем на ранних стадиях исследования, а также обосновать выбор безопасных и эффективных доз. Данный подход позволяет существенно сократить (Reduction) общее количество лабораторных животных необходимых для последующих экспериментов *in vivo,* без потери статистической значимой достоверности результатов. В свою очередь применение современных валидированных моделей патологий и оптимизация протоколов введения новых препаратов способствуют максимальному снижению болевой и стрессовой нагрузки на экспериментальных животных, что способствует принципу совершенствования (Refinement) исследования на всех его этапах [124].

В рамках данного подхода применение субкритической CO_2-экстракции рассматривается не только как технологический, а как преаналитический этап. Физико-химические особенности жидкого диоксида углерода позволяют

извлекать нативный комплекс липофильных и умеренно полярных метаболитов в условиях полного отсутствия термической деструкции и кислородной деградации.

Для первичного скрининга и объективной оценки антиоксидантного потенциала многокомпонентных полифенольных комплексов, таких как CO_2-экстракт *A. tomentosum,* классическим подходом является сочетанное применение методов DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) и FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) [125]. Целесообразность использования данной комбинации обусловлена необходимостью оценки антиоксидантного потенциала через два фундаментально различных химических механизма. Тест DPPH базируется на реакции переноса атома водорода от молекулы антиоксиданта к стабильному свободному радикалу 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилу, что имитирует ингибирование цепной реакции окислительного стрресса в живом организме. Тест FRAP основан на механизме одноэлектронного восстановления ионов железа. Данный тест позволяет оценить способность антиоксидантов восстанавливать комплекс трехвалентного железа до интенсивно окрашенного двухвалентного. Данный метод служит прямым индикатором восстановительной способности новых фитопрепаратов, что крайне важно, так как способность восстанавливать металлы переменной валентности напрямую коррелирует с возможностью блокировать инициацию перекисного окисления липидов (ПОЛ) в билипидных мембранах клеток. Таким образом, одновременное использование DPPH и FRAP тестов позволяет нивелировать специфические ограничения каждого отдельного метода и получить взаимодополняющие данные о механизмах антиоксидантного потенциала флавоноидов, фенольных кислот и других вторичных метаболитов содержащихся в исследуемом растительном сырье [126].

Оценка антимикробной активности является обязательным этапом для исследования растительных экстрактов, претендующих на звание фитопрепаратов широкого спектра действия [127]. Согласно литературным данным, при патологиях паренхиматозных органов повышается риск вторичных инфекции с последующим поступлением эндотоксинов в портальный кровоток. Это в свою очередь провоцирует каскад воспалительных реакций и цитокин-опосредованного повреждения печеночной ткани. По данной причине, оценка антимикробной активности позволяет исследовать способность новых фитопрепаратов уменьшить потенциальную антигенную нагрузку на печень, что способствует предотвращению вторичных инфекций и последующей гепатотоксичности [128].

Оценка цитотоксического влияния на клеточных культурах является предварительным этапом для исследования безопасности новых фитопрепаратов [129]. В доклинических исследованиях широко применяется тетразолиевый тест (МТТ-тест) позволяющий изучить потенциальное цитотоксическое влияние и установить диапазон безопасных концентрации новых фитопрепаратов на клеточных культурах [130]. Данный подход обеспечивает предварительный скрининг безопасности *in vitro* и позволяет оптимизировать протоколы

последующих этапов исследования *in vivo* в соответствии с принципами биоэтики «3R».

Исследование безопасности в остром и подостром экспериментах *in vivo* проводится в строгом соответствии с международными требованиями и методическими рекомендациями [131]. Целью данного этапа является – выявление потенциального токсического влияния новых фитопрепаратов на организм экспериментальных животных при однократном и многократном введении. Методология исследования острой токсичности предполагает мониторинг динамики массы тела, расчет относительных весовых коэффициентов внутренних органов и макроскопический анализ внутренних органов после однократного введения исследуемого фитопрепарата. В свою очередь методология исследования подострой токсичности помимо вышеперечисленного включает в себя общий анализ крови, исследование биохимических показателей сыворотки и гистологическое исследование клеток и тканей внутренних органов после многократного введения исследуемого фитопрепарата. Даный комплексный подход позволяет верифицировать безопасность для дальнейшего исследования эффективности новых фитопрепаратов в безопасных дозах.

Заключительным этапом в доклинических исследованиях является верификация биологической эффективности новых фитопрепаратов на моделях патологий. Выбор моделей различной этиологии позволят выявить механизм биологической активности исследуемых фитопрепаратов. Такой подход позволяет всесторонне оценить гепатопротекторный потенциал исследуемых соединений.

Моделирование метаболических нарушений, индуцированных несбалансированным рационом питания (высокоуглеводный/высокожировой), применяется в мировой практике для изучения хронических диффузных изменений печени. Данная модель позволяет оценить способность новых фитопрепаратов предотвращать жировое перерождение печени и последующий стеатогепатит, а также нормализовать углеводный/липидный/белковый метаболизм [132].

В свою очередь, для оценки прямого цитопротекторного действия традиционно используется модели токсин-индуцированной гепатотоксичности, которые имитруют острое токсическое поражение печени, что сопровождается массивным повреждением печеночной ткани. В рамках данной модели исследуется способность новых фитопрепаратов защищать ферментные системы печени, поддерживать его белковосинтетическую функцию и предотвращать окислительный стресс, вызванный свободные радикалами от введения токсина [133].

Использование вышеперечисленных дифференциальных моделей позволяет ученым исследовать биологическую активность и эффективность новых фитопрепаратов в качестве потенциальных гепатопротекторов.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Объекты исследований

Arctium L. – это род двулетних растении из семейства Сложноцветных (*Asteraceae*). Данный род включает в себя около 10-ти видов растении, распространенных по всему умеренному поясу Евразии [134]. Объектом исследования являлся собранный в экспедиционных выездах по Алматинской области растение *Arctium tomentosum* Mill. (далее *A. tomentosum*) – лопух войлочный, или паутинистый (каз. – түйежапырақ киіз), один из представителей рода *Arctium L.* является дикорастущим сорным растением, широко распространенным в сорных местах, вдоль дорог, и/или в околожилищных участках, в садах и огородах [135]. *A. tomentosum* является крупным двулетним травянистым растением высотой примерно 60-180 см. Прикорневая розетка листьев вида *A. tomentosum* образуется на первом году жизни. Данный вид лопуха имеет стержневую корневую систему с маловетвистым корнем длиной до 60 см (Рисунок 1А). Его прямой, войлочно-опушенный стебель с листьями и соцветиями образуется на втором году жизни. Листья вида *A. tomentosum* широкосердцевидно-яйцевидной формы, зубчатые и прикреплены к стеблю черешками; цветки трубчатые, собраны в корзинки в форме шара, венчики пурпурной окраски, чашечка имеет форму хохолка, а соцветие приобретает форму щитковидной метелки. Данный вид лопуха выделяется наличием паутинистой оболочки на цветках – по причине чего и имеет данное название (Рисунок 1Б).



А



Б

Рисунок 1 – Фотографии образцов *A. tomentosum*, собранных в предгорной зоне Заилийского Алатау: А – Корни; Б – Листья и цветки

Корни *A. tomentosum* были собраны в Аксайском ущелье, расположенном в западно-центральной части хребта Заилийский Алатау (предгорья Северного Тянь-Шаня, Алматинская область, Казахстан; географические координаты 43°08′52″N, 76°47′56″E; высота 1151.6 м над уровнем моря). Образец хранится в Гербарном фонде Института ботаники и фитоинтродукции под шифром «Herbarium AA0002321» (Приложения Б-В).

2.2 Получение фитопрепарата методом CO_2-экстракции

Собранные образцы корней *Arctium tomentosum* очищали от посторонних примесей, измельчали и высушивали в затененном помещении с естественной вентиляцией. Высушенное растительное сырьё измельчали до размера частиц не более 0.5 мм и фракционировали для обеспечения однородности материала. Просеивание осуществляли на вибрационном устройстве Retsch AS 200 (Retsch GmbH, Германия).

Подготовленное сырьё загружали в экстракционную камеру экстракционной установки. Масса сырья на один цикл экстракции составляла 500 г. Экстракцию проводили жидким диоксидом углерода в докритическом режиме при следующих параметрах: рабочее давление 67 ± 1 бар, температура процесса 24 ± 1 °C, расход растворителя 15 г/мин. Продолжительность одного цикла экстракции составляла 240 мин, что позволяло обеспечить извлечение нативного комплекса биологически активных соединении из плотной матричной структуры растительного сырья

По завершении процесса экстракции осуществлялась декомпрессия и последующее удаление растворителя. В результате был получен густой CO_2-экстракт с характерным специфическим запахом. Готовый CO_2-экстракт (далее – «фитопрепарат», «ФТ») помещали во флаконы из темного стекла и хранили при температуре 4 ± 2 °C до проведения исследований.

2.3 Методы определения содержания биологически активных соединений в составе фитопрепарата и оценки его антиоксидантого потенциала

2.3.1 Методика определения общего содержания флавоноидов (TFC)

Общее содержание флавоноидов было определено с использованием спектрофотометрического метода, основанном на образовании комплексов с хлоридом алюминия в присутствии ацетата натрия [136].

Для проведения данного анализа фитопрепарат предварительно растворяли в изопропаноле (обеспечивающем полную растворимость липофильных компонентов) до получения гомогенного раствора. К 1.0 мл полученного раствора добавляли 5.0 мл 10% водного раствора ацетата натрия и 3.0 мл 2.5% метанольного раствора хлорида алюминия. Полученную смесь количественно переносили в мерную колбу объемом 25.0 мл, доводили объем до метки метанолом и тщательно перемешивали.

Реакционную смесь инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. Оптическую плотность измеряли при длине волны 430 нм на спектрофотометре Cintra 101 UV–Vis (GBC Scientific Equipment, Кисборо, Австралия). Измерения проводили относительно контрольного раствора, содержащего все реактивы, за исключением хлорида алюминия, чтобы исключить влияние собственной окраски фитопрепарата.

Для количественной оценки использовали калибровочную кривую, построенную по стандартным растворам, рутина. Результаты выражали в миллиграммах эквивалентов рутина на 1 мл экстракта (мг ЭР/мл).

2.3.2 Методика определения общего содержания фенольных кислот (ТРА)

Общее содержание фенольных кислот было определено путемспектрофотометрического метода с использованием реагента Арноу (смесь нитрита натрия и молибдата натрия в соотношении 1:1). Данная методика основана на образовании окрашенного комплекса с орто-дигидроксифенольными соединениями в щелочной среде [137].

Для проведения данного анализа фитопрепарат предварительно растворяли в изопропаноле до получения гомогенного раствора. К 1.0 мл полученного раствора последовательно добавляли 1.0 мл 0.5 н. раствора соляной кислоты, 1.0 мл реагента Арноу и 1.0 мл 1.0 н. раствора гидроксида натрия. Полученную смесь количественно переносили в мерную колбу объемом 10.0 мл и доводили объем до метки дистиллированной водой.

Оптическую плотность измеряли сразу после развития окраски при длине волны 500 нм на спектрофотометре Cintra 101 UV-Vis (GBC Scientific Equipment, Кисборо, Австралия) относительно контрольного раствора, содержащей все реактивы, кроме реагента Арноу.

Количественную оценку проводили методом калибровочной кривой с использованием кофейной кислоты в качестве стандартного образца. Выбор кофейной кислоты обусловлен ее принадлежностью к группе гидроксикоричных кислот и наличием орто-дигидроксильной группы, вступающей в реакцию с используемым реагентом. Результаты выражали в миллиграммах эквивалентов кофейной кислоты на 1 мл экстракта (мг ЭКК/мл).

2.3.3 Методика идентификации полифенольного состава

Качественный и количественный анализ полифенольных метаболитов в составе исследуемого фитопрепарата проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Анализ выполняли на хроматографической системе Shimadzu Nexera I LC/MS-8045 (Shimadzu, Киото, Япония) при следующих условиях хроматографического разделения: стационарная фаза – обращенно-фазовая аналитическая колонка С18; подвижная фаза – система растворителей, состоящая из деионизированной воды с добавлением муравьиной кислоты (компонент А) и метанола (компонент Б); режим элюирования – градиентный.

Перед введением в хроматографическую систему образцы фитопрепарата подвергали дегазации и фильтрованию через мембранный фильтр с диаметром пор 0.22 мкм для удаления взвешенных микрочастиц.

Детекцию и идентификацию целевых полифенольных соединений осуществляли в режиме тандемной масс-спектрометрии. Опознавание индивидуальных веществ (включая флавоноиды, их гликозиды и агликоны, а также фенольные соединения) проводили в автоматическом режиме на

основании физико-химических характеристик: времени удерживания (t_R) молекул на колонке и масс-спектров прекурсорных ионов и характеристичных дочерних ионов (фрагментов), полученных путем сопоставления с аналитическими стандартами чистых соединений и данными специализированных библиотек масс-спектров.

2.3.4 Методика оценки антирадикальной активности фитопрепарата в тесте DPPH

Антирадикальная активность фитопрепарата была определена с использованием DPPH-теста. Данный метод основан на изучении антиоксидантного потенциала фитопрепаратов по их способности нейтрализовать стабильный хромогенный радикал 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (DPPH). С использованием спектрофотометрии была определена интенсивность перехода окраски DPPH из фиолетовой в желтую при его восстановлении до нерадикальной формы DPPH-H под действием антиоксидантов, содержащих в своей структуре фенольное кольцо со свободными гидроксильными группами [138].

Для проведения анализа рабочий раствор DPPH готовили в метаноле до концентрации 0.1 мМ, а образцы фитопрепарата вносили в реакционную смесь в объёмах 4, 8 и 12 мкл/мл на 5 мл раствора DPPH. Полученные смеси тщательно перемешивали и инкубировали в темноте при температуре 40 °C в течение 30 минут.

Оптическую плотность измеряли при длине волны 517 нм. В качестве контроля использовали смесь 5 мл раствора DPPH и соответствующего объема метанола (4, 8 или 12 мкл).

Процент антирадикальной активности рассчитывали по формуле:

$$\text{DPPH (\%)} = \left(\frac{\text{OD контроль} - \text{OD опыт}}{\text{OD контроль}}\right) \times 100, \qquad (1)$$

где:

$OD_{опыт}$ – оптическая плотность образца фитопрепарата;

$OD_{контроль}$ – оптическая плотность контроля.

На основании зависимости «концентрация фитопрепарата – процент ингибирования» методом линейной регрессии рассчитывали показатель IC_{50} мг/мл – концентрацию фитопрепарата, необходимую для нейтрализации 50% радикалов DPPH.

2.3.5 Методика оценки восстановительной способности фитопрепарата в тесте FRAP

Восстановительную способность фитопрепарата определяли методом FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), основанным на реакции переноса электронов и последующем восстановлении бесцветного комплекса Fe^{3+}-

трипиридилтриазин (Fe^{3+}-TPTZ) до интенсивно окрашенного в синий цвет комплекса Fe^{2+}-TPTZ под действием антиоксидантов [139].

Для приготовления рабочего реактива FRAP смешивали 300 мМ ацетатного буфера (pH 3.6), 10 мМ раствора TPTZ в 40 мМ HCl и 20 мМ раствора $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ в соотношении 10:1:1 (v/v/v) *ex tempore.* Для проведения анализа 0.02 мл фитопрепарата разводили в 0.18 мл метанола (коэффициент разведения 1:10), смешивали с 0.6 мл дистиллированной воды и 6.0 мл термостатированного (37°C) реактива FRAP. Смесь инкубировали в темноте в течение 5 минут при температуре 37°C, после чего измеряли оптическую плотность при 593 нм против контрольной пробы, содержащей 6.0 мл реактива FRAP и 0.8 мл дистиллированной воды.

Количественную оценку проводили по калибровочному графику, построенному с использованием стандартных растворов тролокса (водорастворимого аналога витамина Е), результаты выражали в микромолях эквивалента тролокса на 1 мл экстракта (мкмоль ЭТ/мл).

2.4 Методы изучения биологической активности фитопрепарата *in vitro*

2.4.1 Методика изучения цитотоксического влияния фитопрепарата

Цитотоксическое влияние фитопрепарата оценивали с использованием тетразолиевого теста (МТТ-тест), основанного на определении жизнеспособности мононуклеарных клеток периферической крови с использованием спектрофотометрического метода [140].

Для подготовки клеточной культуры криоконсервированные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC; BPS Bioscience, США) быстро размораживали на водяной бане при 37 °C, после чего переносили в избыток теплой бессывороточной среды RPMI-1640 для отмывки от криопротектора. После центрифугирования (300 g, 5 мин, 20 °C) удаляли, а осадок клеток ресуспендировали в полной культуральной среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Германия), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина и 100 мкг/мл стрептомицина.

Перед посевом проводили оценку концентрации и жизнеспособности клеток путем прямого подсчета в камере Горяева. Для этого клеточную суспензию смешивали в соотношении 1:1 с 0.4% раствором трипанового синего. К дальнейшей работе допускались суспензии с жизнеспособностью не менее 95% (оценка методом исключения красителя). Путем добавления полной питательной среды общую концентрацию клеток доводили до $1x10^6$ клеток/мл.

Далее по 100 мкл подготовленной клеточной суспензии (10^5 клеток на лунку) распределяли в промаркированные ячейки микропланшета 96-луночного формата (BIOLOGIX, Китай) согласно схеме распределения образцов (Приложение Д). Затем в лунки опытных групп добавляли по 100 мкл растворов фитопрепарата в диапазоне из 13 финальных концентраций (от 0.001 до 5 мг/мл). Выбор данного интервала был обусловлен необходимостью построения кривой

«концентрация фитопрепарата – процент жизнеспособных клеток», позволяющей определить как концентрации, вызывающие тотальную гибель клеточной популяции (верхний порог), так и диапазон максимальных концентраций, не проявляющих цитотоксическое влияние (нижний порог).

Растворы фитопрепарата предварительно готовили в диметилсульфоксиде (ДМСО) (Thermo Fisher Scientific, США) и разводили культуральной средой таким образом, чтобы финальная концентрация ДМСО в каждой ячейке планшета строго составляла ≤ 0.1%, что биологически совместимо с клеточной культурой и не влияет на её жизнеспособность. Контрольные ячейки инкубировали с добавлением 100 мкл чистой среды (без фитопрепарата), содержащей 0.1% ДМСО. Общий рабочий объем среды в каждой лунке составлял 200 мкл. Клетки инкубировали с препаратом в течение 48 часов при 37 °C в атмосфере 5% CO_2 и 95% воздуха.

За 4 часа до окончания инкубации во все лунки планшета добавляли по 20 мкл водного раствора МТТ (5 мг/мл, Thermo Fisher Scientific, США). В живых клетках митохондриальные дегидрогеназы восстанавливали желтый тетразол (МТТ) до нерастворимого пурпурного формазана.

По истечении времени инкубации, ввиду того что PBMC являются суспензионной культурой, микропланшет центрифугировали при 300 g в течение 10 минут при комнатной температуре для полного осаждения клеток и кристаллов формазана на дно лунок. После этого супернатант аккуратно удаляли методом аспирации, а образовавшиеся кристаллы формазана растворяли добавлением 100 мкл ДМСО в каждую ячейку при постоянном плавном встряхивании планшета на шейкере в течение 10 минут.

Оптическую плотность (OD), пропорциональную количеству жизнеспособных клеток, измеряли на универсальном ридере микропланшетного формата Sunrise TS (Tecan, Австрия) при 540 нм (с референтной длиной волны 620 нм). Процент жизнеспособности клеток рассчитывали по формуле:

$$\text{Жизнеспособность клеток (\%)} = \left(\frac{\text{OD опыт} - \text{OD бланк}}{\text{OD контроль} - \text{OD бланк}}\right) \times 100, \quad (2)$$

где:

$OD_{опыт}$ – оптическая плотность образца (клетки + фитопрепарат + МТТ);

$OD_{бланк}$ – оптическая плотность бланк-раствора (среда + МТТ без клеток);

$OD_{контроль}$ – оптическая плотность контроля (клетки + МТТ без фитопрепарата).

На основании полученных данных жизнеспособности клеток в программе GraphPad Prism методом нелинейной регрессии (four-parameter logistic curve) была построена кривая «концентрация фитопрепарата – жизнеспособность клеток» с последующим расчетом полумаксимальной ингибирующей концентрации IC_{50} и определением диапазона концентраций, при котором фитопрепарат не проявляет цитотоксического влияния.

2.4.2 Методика изучения антимикробной активности фитопрепарата

Оценка антимикробной активности фитопрепарата была проведена в соответствии с руководствами Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M07-A10 для бактерий и CLSI M27-A3 для дрожжей) методом двукратных серийных микроразведений в жидкой среде. Исследование выполняли в отношении тест-штаммов *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* для оценки антибактериального действия, а также *Candida albicans* для определения фунгицидной активности [141, 142].

Расчет стартовых навесок исследуемого фитопрепарата и референтных субстанций проводили стандартным методом с учетом ограничений предельной растворимости веществ.

В качестве стоковых растворов фитопрепарата 1.0 г экстракта растворяли в 3.0 мл диметилсульфоксида (ДМСО) (Thermo Fisher Scientific, США), получая исходную концентрацию 333 333 мкг/мл. Ввиду отсутствия точных данных о концентрации индивидуального действующего вещества, активность исходного фитопрепарата условно принимали за 100%. Финальная концентрация ДМСО в рабочих лунках не превышала 1%, что не оказывало ингибирующего влияния на рост микроорганизмов.

В качестве стоковых растворов Хлорамфеникола (референтный контроль для *E. coli*): 0.05 г данного препарата растворяли в 2.5 мл 0.9% NaCl для получения раствора с исходной концентрацией – 20 000 мкг/мл.

В качестве стоковых растворов Ампициллина (референтный контроль для *S. aureus*): 0.04 г данного препарата растворяли в 5.0 мл 0.9% NaCl для получения раствора с исходной концентрацией – 8 000 мкг/мл.

В качестве стоковых растворов Нистатина (референтный контроль для *C. albicans*): 0.01 г данного препарата растворяли в 10.0 мл 0.9% NaCl для получения раствора с исходной концентрацией – 1 000 мкг/мл.

Рабочую суспензию каждого штамма готовили прямым методом колоний: аликвоту суточной культуры переносили в пробирку со стерильным 0.9%-м раствором хлорида натрия до достижения мутности 0.5 ед. по МакФарланду (~1.5×10^8 КОЕ/мл для бактерий и 1-5×10^6 КОЕ/мл для *Candida albicans*). Для получения рабочих суспензий культуру бактерий разводили стерильным бульоном в соотношении 1:100 (до ~1.5×10^6 КОЕ/мл), а культуру дрожжей – 1:1000 (до ~1-5×10^3 КОЕ/мл).

Тестирование антимикробной активности проводили в микропланшетах 96-луночного формата (BIOLOGIX, Китай). В каждую лунку предварительно вносили 100 мкл соответствующей жидкой среды: бульон Мюллера-Хинтона для бактерий и бульон Сабуро для дрожжей (Himedia, Индия). В первые лунки добавляли 100 мкл исходного раствора фитопрепарата или референсного антимикробного средства, после чего осуществляли последовательные двукратные разведения путём переноса 100 мкл смеси из лунки в лунку с тщательным перемешиванием. Из последней лунки удаляли 100 мкл для выравнивания объёма и обеспечения корректной кратности разведений. Раскапывание образца исследуемого фитопрепрепарата, референсных

антимикробных препаратов и ДМСО в ячейки микропланшета осуществляли по многорядной схеме последовательного переноса (Приложение Е).

Таким образом, в лунках №1 (первый шаг разведения) фиксировались следующие стартовые рабочие концентрации: фитопрепарат – 166 666.7 мкг/мл, хлорамфеникол – 10 000 мкг/мл, ампициллин – 4 000 мкг/мл, нистатин – 500 мкг/мл. После подготовки разведений в лунки вносили подготовленный рабочий инокулят штаммов: по 10 мкл для бактериальных культур (*S. aureus* и *E. coli*) и по 100 мкл для культуры дрожжей *(C. albicans).* Микропланшеты инкубировали в термостате (Binder, Германия) при температуре 37 °C: бактерии – в течение 18-24 часов, дрожжи – 46-50 часов.

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) определяли визуально по наименьшей концентрации, при которой полностью отсутствовал видимый рост (помутнение) микроорганизмов в лунке. Минимальную бактерицидную или фунгицидную концентрацию (МБК/МФК) определяли путём пересева содержимого лунок без видимого роста (0.01-0.02 мл) на плотный питательный агар с последующей инкубацией при аналогичных условиях; отсутствие роста после пересева свидетельствовало о бактерицидном или фунгицидном эффекте фитопрепарата.

2.5 Методы исследования биологической активности фитопрепарата *in vivo*

Исследования биологической активности фитопрепарата *in vivo* проводились на мышах линии Swiss (Рисунок 2). Животные содержались в стандартных условиях при температуре 22 ± 2 °C, относительной влажности 50-60 % и 12-часовом световом цикле, со свободным доступом к воде и корму.

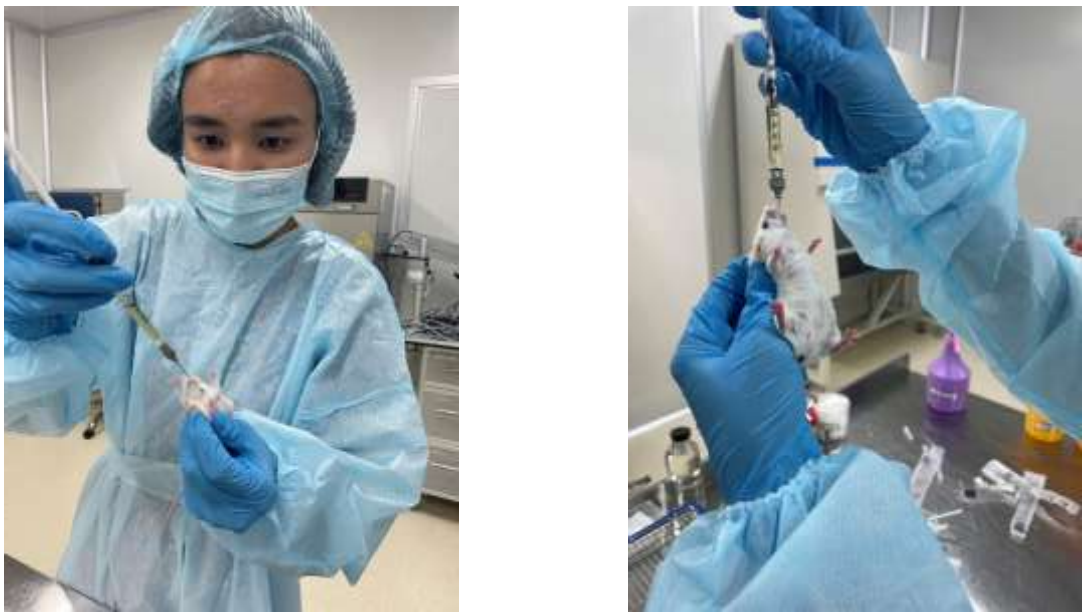


Рисунок 2 – Фотоотчет исследования биологической активности фитопрепарата *in vivo*

Учитывая липофильную природу исследуемого фитопрепарата, во всех экспериментах *in vivo* в качестве носителя использовали 0.5% водный раствор натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США). Данный полимерный носитель официально признан Европейским агентством по безопасности продуктов питания (EFSA) полностью безопасным для животных [143]. Кроме того, выбор Na-КМЦ обусловлен ее полной химической и метаболической инертностью: она не обладает собственной калорийностью (что исключает интерференцию с высокоуглеводным рационом в модели метаболического синдрома) и не влияет на ферментативные системы печени грызунов. Вводимые формы фитопрепарата готовили непосредственно перед манипуляциями путем точного взвешивания навески экстракта и его последующего гомогенного суспендирования в носителе. Готовую суспензию вводили животным перорально с помощью внутрижелудочного зонда в стандартизированном объеме 0.1 мл на 10 г массы тела мыши. Животные контрольной группы получали эквивалентный объем 0.5% раствора Na-КМЦ по аналогичной схеме для исключения потенциального влияния вязкости носителя на моторику желудочно-кишечного тракта и стандартизации условий эксперимента.

Все процедуры по содержанию, уходу и манипуляциям с лабораторными животными проводились в строгом соответствии Приказа Министра здравоохранения Республики Казахстан от 12 ноября 2020 года № ҚР ДСМ-190/2020 «Об утверждении правил проведения доклинических (неклинических) исследований». Методология работы соответствовала требованиям национального стандарта СТ РК ISO 10993-2-2011, принципам надлежащей лабораторной практики СТ РК 1613-2006, а также международным рекомендациям ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments). Протокол экспериментальных исследований был рассмотрен и официально одобрен Локальной комиссией по биоэтике (Приложение Ж).

2.5.1 Методы исследования безопасности фитопрепарата

2.5.1.1 Методика исследования острой токсичности фитопрепарата

Исследование острой токсичности проводили в соответствии с требованиями Руководства OECD №420 при однократном пероральном введении фитопрепарата мышам [144]. По литературным данным экстракты, полученные из *Arctium lappa* L., характеризуются низкой токсичностью при однократном пероральном введении экспериментальным животным [145]. На основании литературных данных для исследования острой токсичности фитопрепарата из корня *Arctium tomentosum* Mill. были выбраны две предельные дозы – 2000 и 5000 мг/кг, что соответствует рекомендациям Руководства OECD №420 для веществ с предполагаемой низкой токсичностью, когда применение более низких ступенчатых доз в исследовании острой токсичности не является целесообразным. Выбор предельных доз позволил верифицировать безопасность фитопрепарата при максимальной пероральной экспозиции и сократить

количество используемых животных, что соотвествует биоэтическому принципу Reduction (сокращение) концепции 3R.

Животные были разделены на 3 группы по 5 особей (самцы) в каждой группе: 1 – контрольная, 2 – опытная, животные получали 2000 мг/кг фитопрепарата и 3 – опытная, животные получали 5000 мг/кг фитопрепарата.

После однократного перорального введения фитопрепарата в исследуемых дозах животные находились под наблюдением на симптомы острой токсичности и гибели, а также взвешивались еженедельно в течение 14 дней. Согласно методике OECD №420 в случае 50%-ной гибели животных в опытных группах определяется средняя летальная доза (далее LD_{50}), однако при отсутствии гибели проводится только определение класса токсичности соответствии с классификацией OECD №420, согласно которой вещества I класса считаются чрезвычайно токсичными (LD_{50} < 5 мг/кг), II класса – высокотоксичными (LD_{50} 5-50 мг/кг), III класса – умеренно токсичными (LD_{50} 51-300 мг/кг), IV класса – малотоксичными (LD_{50} 301–2000 мг/кг), V класса – практически нетоксичными (LD_{50} 2001-5000 мг/кг), а вещества VI класса относятся к категории безвредных (LD_{50} > 5000 мг/кг). В случае отсутствия гибели животных опытных групп при введении исследуемого фитопрепарата он подлежит отнесению к VI классу токсичности, соответствующему нетоксичным веществам.

По окончании эксперимента на 15-ый день был проведен отбор крови из ретроорбитального синуса под глубокой анестезией изофлураном (Piramal Enterprises Limited, Телангана, Индия). По завершении забора крови, при сохранении состояния наркоза, животных подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации с последующим извлечением, взвешиванием и макроскопическим осмотром внутренних органов (сердце, печень, почки, селезенка, легкие и тимус). Согласно руководству OECD №420 если отсутствуют гибель животных, клинические признаки токсичности и явные макроскопические изменения внутренних органов, проведение гистологического исследования не является обязательным. Также такой подход соответствует практике, описанной в современных публикациях по острой токсичности растительных экстрактов [146-148].

2.5.1.2 Методика исследования подострой токсичности фитопрепарата

Исследование подострой токсичности проводили в соответствии с требованиями Руководства OECD №407 путем многократного перорального введения фитопрепарата в течение 28-ми дней в дозах 200 и 400 мг/кг мышам [149]. Данные дозы были выбраны на основании результатов острой токсичности, при которой фитопрепарат не вызывал гибели или клинических признаков токсичности при предельных дозах 2000 и 5000 мг/кг. Также дозы 200 и 400 мг/кг (примерно 4 и 8 % от предельной дозы 5000 мг/кг) соответствуют терапевтически эффективному диапазону, выявленному в предыдущих фармакологических исследованиях экстрактов из корней *A. lappa*, и позволяют оценить возможные субхронические эффекты с двухкратным градиентом доз для выявления дозозависимых изменений, в соответствии с рекомендациями OECD

407. Дополнительно выбор данных доз был методологически обоснован путем масштабирования безопасного диапазона концентрации из исследования цитотоксического влияния фитопрепарата на культуре мононуклеарных клеток периферической крови *in vitro* (0.001-0.078 мг/мл) на объем общей жидкости организма экспериментальных животных.

Животные были разделены на 6 групп по 5 особей в каждой: 1 – контрольная (самцы); 2 – контрольная (самки); 3 – опытная (самцы) и 4 – опытная (самки), которые получали 200 мг/кг фитопрепарата; 5 – опытная (самцы) и 6 – опытная (самки), которые получали 400 мг/кг фитопрепарата. Многократное пероральное введение фитопрепарата осуществлялось в течение 28-ми дней, в этот же период животные находились под наблюдением на проявление симптомов острой токсичности и/или гибели, а также взвешивались еженедельно в течение 28-ми дней.

По окончании эксперимента на 29-ый день был проведен отбор крови из ретроорбитального синуса под глубокой анестезией изофлураном (Piramal Enterprises Limited, Телангана, Индия). По завершении забора крови, при сохранении состояния наркоза, животных подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации с последующим извлечением, взвешиванием и макроскопическим осмотром внутренних органов (сердце, печень, почки, селезенка, легкие, тимус, семенники и яичники).

Для гематологических исследований (эритроциты, гемоглобин, гематокрит, эритроцитарные индексы, лейкоциты, лейкоцитарная формула и тромбоциты) кровь собирали в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА, осторожно перемешивали и анализировали с использованием автоматического гематологического анализатора Z52 VET (Zytopia Ltd, Китай) согласно инструкции производителя.

Для биохимических исследований кровь собирали в пробирки с активатором свертывания (без антикоагулянта). После полного свертывания образцы центрифугировали (1000 g, 15 мин, 20 °C), сыворотку аккуратно отделяли и использовали для определения биохимических показателей (аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), креатинин, мочевина, общий белок (ОБ)) с использованием автоматического биохимического анализатора BioSystems A-25 (BioSystems S.A., Испания) согласно инструкции производителя.

Для гистологических исследований образцы сердца, печени, почек, селезёнки, лёгких, тимуса, яичек и яичников фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов. После фиксации ткани подвергали дегидратации в растворах этанола возрастающей концентрации, просветлению в ксилоле и заливали в парафин. Из парафиновых блоков получали срезы толщиной 5-7 мкм с использованием ротационного микротома Leica HistoCore BioCut (Leica Biosystems, Германия). Срезы депарафинировали, регидратировали и окрашивали гематоксилином и эозином, после чего проводили обезвоживание и заключение препаратов под покровное стекло. Микроскопическое

исследование и фотографирование выполняли с использованием светового микроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия).

2.5.2 Методы исследования эффективности фитопрепарата

2.5.2.1 Модель метаболического синдрома

Животные были разделены на 5 групп по 5 особей (самцы): 1 – контрольная (животные), 2 – опытная, животные с метаболическим синдромом (МС), 3 – опытная, животные получали 50 мг/кг фитопрепарата, 4 – опытная, животные получали 200 мг/кг фитопрепарата, 5 – опытная, животные получали 400 мг/кг фитопрепарата. Дозы 50, 200 и 400 мг/кг фитопрепарата были выбраны исходя из результатов, полученных в ходе исследования подострой токсичности, а также с учетом данных из литературы о терапевтической эффективности экстракта из корней *A. lappa* в экспериментальных моделях метаболического синдрома [150]. Таким образом, выбранные дозы фитопрепарата обеспечивают градиент от минимально ожидаемого до максимально эффективного воздействия без проявления токсичности.

Для моделирования метаболического синдрома животные опытных групп в течение 8 недель получали сухой корм с высоким содержанием углеводов – 600 г/кг (Teklad Laboratory Diets, USA) согласно методике по ранее проведенным исследованиям [151]. Контрольная группа животных получала стандартный корм. Доступ к питьевой воде для всех групп оставался свободным. После 8-ми недель высокоуглеводного рациона для подтверждения метаболических нарушений было проведено подтверждение метаболических нарушений с использованием промежуточных данных животных сателлитной группы (n=3). Начиная с 9-й недели, животные третьей, четвертой и пятой групп на фоне продолжающегося высокоуглеводного рациона перорально получали исследуемый фитопрепарат в дозах 50, 200 и 400 мг/кг соответственно

По окончании 14-ти недель эксперимента, на 15-ой неделе были проведены взвешивание животных и отбор крови из ретроорбитального синуса под глубокой анестезией изофлураном (Piramal Enterprises Limited, Телангана, Индия). По завершении забора крови, при сохранении состояния наркоза, животных подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации с последующим извлечением, взвешиванием и макроскопическим осмотром внутренних органов (печень, почки и висцеральный жир).

Для биохимических исследований кровь собирали в пробирки с активатором свертывания (без антикоагулянта). После полного свертывания образцы центрифугировали (1000 g, 15 мин, 20 °C), сыворотку аккуратно отделяли и использовали для определения биохимических показателей (аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), общий холестерин (ОХ), триглицериды (ТГ), липопротеины высокой плотности (ЛПВП), липопротеины низкой плотности (ЛПНП), глюкоза) с использованием автоматического биохимического анализатора BioSystems A-25 (BioSystems S.A., Испания) согласно инструкции производителя.

Концентрацию инсулина в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием коммерческого набора для определения инсулина у мышей (Elabscience Biotechnology Inc., США) согласно инструкции производителя.

Для оценки степени инсулинорезистентности рассчитывали HOMA-IR (индекс оценки гомеостатической модели инсулинорезистентности) по формуле:

$$\text{HOMA-IR} = (\text{глюкоза} \times \text{инсулин}) / 22.5. \quad (3)$$

Полученные значения HOMA-IR использовались в качестве показателей инсулинорезистентности (увеличение отражает снижение чувствительности тканей к инсулину). Оценка проводилась без использования фиксированных пороговых значений.

Для гистологических исследований образцы печени фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов. После фиксации ткани подвергали дегидратации в растворах этанола возрастающей концентрации, просветлению в ксилоле и заливали в парафин. Из парафиновых блоков получали срезы толщиной 5-7 мкм с использованием ротационного микротома Leica HistoCore BioCut (Leica Biosystems, Германия). Срезы депарафинировали, регидратировали и окрашивали гематоксилином и эозином, после чего проводили обезвоживание и заключение препаратов под покровное стекло. Микроскопическое исследование и фотографирование выполняли с использованием светового микроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия).

2.5.2.2 Модель CCl_4-гепатотоксичности

Для данного исследования была выбрана модель CCl_4-гепатотоксичности, которая является общепринятой для оценки гепатопротекторного эффекта [152]. Животные были разделены на 5 групп по 5 особей (самцы): 1 – контрольная группа, 2 – опытная, животные с моделью CCl_4-гепатотоксичности (CCl_4), 3 – опытная, животные получали 50 мг/кг фитопрепарата, 4 – опытная, животные получали 200 мг/кг фитопрепарата, 5 – опытная, животные получали 400 мг/кг фитопрепарата. Всем животным кроме контрольных вводили CCl_4 в дозе 1 мл/кг на 1-ый, 3-ий, 5-ый дни и в те же дни через 4 часа после введения CCl_4 животные опытных групп получали фитопрепарат в дозах 50, 200 и 400 мг/кг.

По окончании эксперимента на 7-ой неделе был проведен отбор крови из ретроорбитального синуса под глубокой анестезией изофлураном (Piramal Enterprises Limited, Телангана, Индия). По завершении забора крови, при сохранении состояния наркоза, животных подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации с последующим извлечением, взвешиванием и макроскопическим осмотром печени.

Для биохимических исследований кровь собирали в пробирки с активатором свертывания (без антикоагулянта). После полного свертывания образцы центрифугировали (1000 g, 15 мин, 20 °C), сыворотку аккуратно отделяли и использовали для определения биохимических показателей

(аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ) общий белок (ОБ) и альбумин) с использованием автоматического биохимического анализатора BioSystems A-25 (BioSystems S.A., Испания) согласно инструкции производителя.

Для исследования маркеров окислительного стресса была проведена экстракция общего белка из образцов печени путем гомогенизации навески в соотношении 1:10 (вес/объем) с использованием 0.1 М раствора фосфатного буфера (pH 7.4) при температуре 4°C. Для отделения клеточного дебриса полученный гомогенат центрифугировали (10 000 g, 15 мин, 4 °C), после чего в супернатанте была исследована активность антиоксидантных ферментов. Анализ проводили спектрофотометрически с использованием коммерческих наборов (BioVision, США) согласно протоколам производителя: активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по степени ингибирования восстановления тетразолиевого красителя (WST-1) супероксидными радикалами, генерируемыми ксантиноксидазой; активность каталазы (КАТ) оценивали по скорости ферментативной деградации перекиси водорода; активность глутатионпероксидазы (ГП) анализировали в сопряженной глутатионредуктазной реакции по кинетике окисления НАДФН при длине волны 340 нм.

Интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по концентрации малонового диальдегида (МДА). Метод основан на взаимодействии МДА с тиобарбитуровой кислотой при высокой температуре в кислой среде с образованием окрашенного триметинового комплекса. Измерение оптической плотности проб проводили на спектрофотометре BioMate 3S (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 532 нм.

Для гистологических исследований образцы печени фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов. После фиксации ткани подвергали дегидратации в растворах этанола возрастающей концентрации, просветлению в ксилоле и заливали в парафин. Из парафиновых блоков получали срезы толщиной 5-7 мкм с использованием ротационного микротома Leica HistoCore BioCut (Leica Biosystems, Германия). Срезы депарафинировали, регидратировали и окрашивали гематоксилином и эозином, после чего проводили обезвоживание и заключение препаратов под покровное стекло. Микроскопическое исследование и фотографирование выполняли с использованием светового микроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия). Для морфометрического анализа оценивали количество интактных гепатоцитов и геепатоцитов с признаками жировой дистрофии и некроза с использованием программы ZEISS ZEN Blue (Carl Zeiss, Германия).

2.6 Методика статистического анализа

Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение (M±m). Статистическая обработка данных была проведена с использованием GraphPad Prism 10.6.1. (GraphPad Software, Сан-Диего,

Калифорния, США). Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p \leq 0.05$.

Для сравнения количественных показателей между группами контрольных и опытных животных был применен однофакторный дисперсионный анализ (ordinary one-way ANOVA) (Таблицы 5, 11-15). Для анализа качественных (номинальных) данных и сравнения частоты проявления клинических симптомов интоксикации между группами использовали критерий Фишера (Fisher's exact test) (Таблица 6).

При анализе данных МТТ-теста и показателей у животных разного пола применяли двухфакторный дисперсионный анализ без повторных измерений (two-way ANOVA). Для множественных сравнений МТТ-теста (Таблица 3) и для сравнений между полами использовался тест Бонферрони, после чего дополнительно применялся тест Даннета для сравнения между группами контрольных и опытных животных (Таблицы 8-10).

При анализе динамики показателей у одних и тех же животных был применен двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями по фактору времени (two-way repeated measures ANOVA), где фактором между группами являлась доза, а фактором внутри групп – период исследования. В анализах, где фактор – период исследования (более двух уровней), после двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями для сравнения групп между собой на каждом уровне (период исследования) применялся тест Даннета (Таблицы 4 и 7).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Фитохимическая характеристика и оценка антиоксидантного потенциала фитопрепарата из корня *Arctium tomentosum* Mill.

Корни *Arctium tomentosum* Mill. были высушены и подвергнуты CO_2-экстракции для получения фитопрепарата. С использованием ВЭЖХ-МС была проведена идентификация и количественное определение содержания фитохимических соединений в составе фитопрепарата. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Идентификация и определение содержания фитохимических соединений в составе фитопрепарата (мкг/мл)

№	Название класса	Название соединения	Время удержания (мин)	R^2	Показатель, M±m
1	Фенольные соединения	Хлорогеновая кислота	12.00	0.995	17.20 ± 0.65
2	Флавонолы	Гиперозид	20.23	0.996	0.36 ± 0.04
		Мирицетин	22.31	0.961	0.23 ± 0.01
3	Флавоноидные гликозиды	Акацетин 7-О-глюкозид	19.83	0.990	56.80 ± 1.66
		Лютеолин-7-О-глюкозид	19.78	0.985	0.21 ± 0.01
4	Фенольные альдегиды	4-Гидрокси-3-метоксибензальдегид	15.18	0.993	0.43 ± 0.02

Как видно из таблицы 1, основной вклад в полифенольный профиль фитопрепарата вносят флавоноидный гликозид акацетин 7-О-глюкозид (56.80 ± 1.66 мкг/мл) и хлорогеновая кислота (17.20 ± 0.65 мкг/мл). На долю сопутствующих компонентов (гиперозид, мирицетин, лютеолин-7-О-глюкозид и 4-гидрокси-3-метоксибензальдегид) приходятся минорные концентрации (от 0.21 до 0.43 мкг/мл). Соответствующие хромматограммы по каждому идентифицированному фитохимическому соединению представлены в Приложении Г (Рисунки Г.1 – Г.12).

Полученные данные о доминировании акацетина 7-О-глюкозида (тиланина) и хлорогеновой кислоты согласуются с литературными данными о фитохимическом составе подземных органов *Arctium lappa* L. [153]. Хлорогеновая кислота является ключевым фенолкарбоновым соединением, определяющим высокий потенциал поглощения свободных радикалов [154]. Флавоноидные гликозиды акацетина, в свою очередь, обладают выраженными противовоспалительными, антиоксидантными и мембраностабилизирующими свойствами [155]

Общее содержание флавоноидов и фенольных соединений в составе фитопрепарата было определено с использованием методик TFC и TPA, оценка его антирадикальной активности была изучена в тесте DPPH, а восстановительная способность в тесте FRAP. Полученные результаты объединены в таблице 2.

Таблица 2 – Общее содержание флавоноидов, фенольных соединений и антиоксидантный потенциал фитопрепарата, M±m

Название теста	Показатель
TFC	6.51 ± 0.02 мг ЭР/мл
TPA	0.96 ± 0.01 мг ЭКК/мл
DPPH (IC_{50} фитопрепарата)	35.00 ± 0.31 мкг/мл
DPPH (IC_{50} тролокса)	11.86 ± 0.02 мкг/мл
FRAP	5.72 ± 0.03 мкмоль ЭТ/мл

Таким образом, в результате комплексной фитохимической характеристики фитопрепарата была выявлено суммарное содержание флавоноидов, выраженное в эквивалентах рутина (TFC – 6.51 ± 0.02 мг ЭР/мл) и фенольных соединений, выраженное в эквивалентах кофейной кислоты (TPA – 0.96 ± 0.01 мг ЭКК/мл). Данная пропорция является характерным хемотаксономическим признаком для представителей рода *Arctium* и подтверждается результатами ВЭЖХ-анализа [156]. Показатель DPPH фитопрепарата (IC_{50} = 35.00 ± 0.31 мкг/мл) был сопоставлен с действием положительного контроля – эталонного синтетического антиоксиданта Тролокса IC_{50} = 11.86 ± 0.02 мкг/мл). Учитывая, что Тролокс представляет собой 100% активное вещество, а фитопрепарат является многокомпонентной смесью, полученный результат может отражать вклад суммарного содержания флавоноидов и фенольных компонентов, а также индивидуальных полифенольных соединений в антирадикальную активность фитопрепарата в тесте DPPH. Данный результат был сопряжен со значением восстановительной способности фитопрепарата в электрон-транспортной реакций по методу FRAP, который составил 5.72 ± 0.03 мкмоль ЭТ/мл.

В результате сравнения полученных результатов с литературными данными было установлено, что количественное содержание фитохимических соединений и антиоксидантный потенциал в тестах DPPH и FRAP сопоставимы с данными, описанными для растительных экстрактов. В ряде фундаментальных исследований отмечается прямая корреляционная зависимость между суммарным содержанием флавоноидов и фенольных кислот и способностью нейтрализовывать свободные радикалы в тесте DPPH, а также восстанавливать комплекс Fe^{3+}/TPTZ в тесте FRAP [157, 158]. Так, в работах зарубежных исследователей показано, что экстракты из корней лопуха большого (*Arctium lappa* L.) характеризуются уровнем хлорогеновой кислоты в пределах 0.8-3.2 мг/г и общим содержанием флавоноидов в диапазоне 0.5-1.5 мг/г [159]. Полученные

результаты (TFC – 6.51 мг ЭР/мл; хлорогеновая кислота – 17.20 мкг/мл) в пересчете на массу сухого экстракта находятся внутри данного диапазона. Результаты исследований антиоксидантного потенциала также находятся в пределах референтных значений для растительных экстрактов: DPPH (IC_{50}) = 35.00 мкг/мл, что эквивалентно 0.035 мг/мл) находится в референтном диапазоне, описанном в литературе от 0.02 до 0.06 мг/мл. При этом восстанавливающая сила исследуемого фитопрепарата по методу FRAP составила 5.72 мкмоль ЭТ/мл, что в пересчете на массу сухого экстракта согласуется с литературными показателями [160]. Суммарные результаты фитохимического и антиоксидантного анализа позволили обосновать переход к следующему этапу исследования фитопрепарата.

3.2 Исследование цитотоксического влияния фитопрепарата

Цитотоксическое влияние фитопрепарата на культуре мононуклеарных клеток было изучено с использованием тетразолиевого теста (МТТ-тест) при концентрациях фитопрепарата: 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.002 и 0.001 мг/мл. Результаты расчета жизнеспособности мононуклеарных клеток представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Жизнеспособность мононуклеарных клеток при исследуемых концентрациях фитопрепарата, M±m.

Концентрация, мг/мл	Оптическая плотность	Жизнеспособность мононуклеарных клеток, %
0.001	0.047 ± 0.001	99.76±0.42
0.002	0.046 ± 0.001	99.52±0.42
0.005	0.045 ± 0.001	97.12±2.16
0.010	0.044 ± 0.001	94.96±2.16
0.020	0.039 ± 0.001	83.45±2.49***
0.040	0.038 ± 0.001	82.01±2.16***
0.078	0.036 ± 0.002	78.42±3.30***
0.156	0.021± 0.022	47.48±2.16***
0.312	0.018 ± 0.001	38.85±2.16***
0.625	0.018 ± 0.001	38.13±1.25***
1.250	0.015 ± 0.001	32.37±2.16***
2.500	0.014 ± 0.001	30.94±1.25***
5.000	0.018 ± 0.001	39.57±2.49***
Контроль	0.046 ± 0.002	98.08±1.66
Примечание: ***p < 0.001 по сравнению с контролем (тест Бонферрони)		

В результате двухфакторного дисперсионного анализа данных из таблицы 3 было выявлено статистически значимое влияние концентрации фитопрепарата на жизнеспособность мононуклеарных клеток. При концентрации 5 мг/мл жизнеспособность данных клеток составила 39.57 %, что

в 2.5 раза ниже значения контроля. При 2.5 мг/мл жизнеспособность мононуклеарных клеток составила 30.94 %, что примерно в 3.2 раза ниже значения контроля. В диапазоне концентраций от 5 до 0.02 мг/мл включительно различия с контролем были статистически значимыми ($p < 0.001$), тогда как в диапазоне от 0.010 до 0.001 мг/мл показатели жизнеспособности клеток статистически значимо не отличались от контроля ($p > 0.05$). При этом в данном диапазоне жизнеспособность мононуклеарных клеток сохранялась на уровне 94.96–99.76%, что свидетельствует об отсутствии выраженного цитотоксического влияния фитопрепарата.

Полученные результаты были использованы для построения кривой «концентрация фитопрепарата – процент жизнеспособных клеток», в результате которого была расчитана IC_{50} равная 0.09 мг/мл ($R^2 = 0.967$). При концентрации 0.078 мг/мл жизнеспособность клеток составляла 78.42 %, однако снижение относительно контроля было статистически значимым ($p < 0.0001$). Таким образом, концентрации фитопрепарата 0.001–0.010 мг/мл характеризовались сохранением жизнеспособности клеток и отсутствием статистически значимого снижения относительно контроля, что позволило рассматривать данный диапазон как цитосовместимый.

Результаты МТТ-теста были опубликованы наряду со скрининговыми исследованиями предварительных этапов безопасности фитопрепарата на первом виде лабораторных грызунов (крысах) [161, 162]. Ввиду того, что дальнейшее изучение терапевтической эффективности фитопрепарата из корня *Arctium tomentosum* выполнялось исключительно на мышах, в настоящий текст диссертации включены более полные и методологически сопоставимые данные исследований острой и подострой токсичности, полученные именно на этой тест-системе.

Дозозависимое влияние фитопрепарата может быть обусловлено фитохимическим составом субкритического CO_2-экстракта *Arctium tomentosum* Mill. Лигнаны рода *Arctium* (в частности, арктиин и его агликон арктигенин), наряду с сопутствующими полифенольными метаболитами различной степени полярности, обладают липофильным свойством. В умеренных концентрациях данные метаболиты выступают в роли антиоксидантов, стабилизаторов клеточных мембран и цитопротекторов. Однако при достижении верхней пороговой концентрации IC_{50} избыток вторичных метаболитов способен повышать проницаемость митохондриальных мембран и индуцировать сигнальные пути апоптоза, что согласуется с литературными данными о дозозависимом влиянии и бифазном действии полифенольных метаболитов на здоровые клетки [163, 164].

3.3 Оценка антимикробной активности фитопрепарата

Исследование антимикробной активности фитопрепарата было проведено с использованием стандартных антимикробных препаратов в качестве положительного контроля и контроля растворителя ДМСО. В ходе эксперимента оценивали антимикробное действие в широких диапазонах концентраций: для

Ампициллина – 0.03-4 мг/мл; Хлорамфеникола – 0.001-10 мг/мл; Нистатина – 0.0001-0.5 мг/мл. Для исследуемого фитопрепарата был выбран значительно более высокий макродиапазон рабочих концентраций – от 1.3 до 166 мг/мл, что было обусловлено его многокомпонентным нативным составом и необходимостью создания концентрации биологически активных соединений (БАС), достаточной для оценки антимикробной активности. По отсутствию видимого роста исследуемых штаммов были определены минимальный бактерицидные концентраций (МБК) в отношении *Staphylococcus aureus (S. aureus)* (Рисунок 3) и *Escherichia coli (E. coli)* (Рисунок 4); и минимальная фунгицидная концентрация (МФК) в отношении *Candida albicans (C. albicans)* (Рисунок 5).

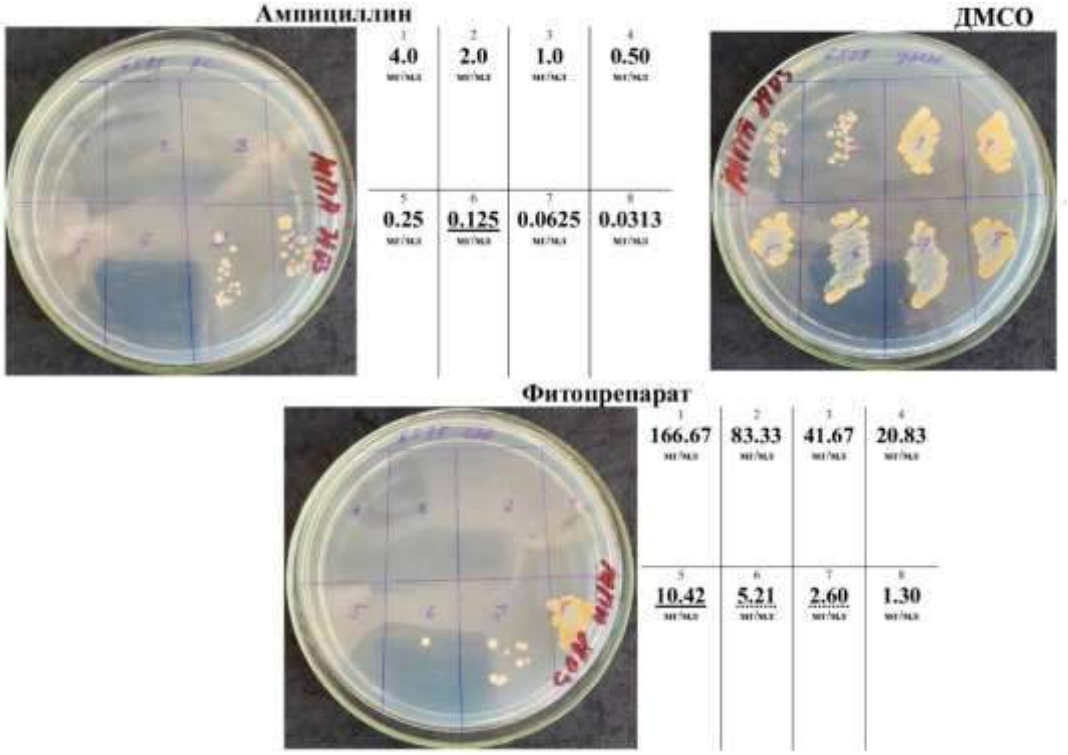


Рисунок 3 – Рост *S. aureus* на питательной среде с добавлением Ампициллина и фитопрепарата: линейное подчеркивание – МБК; пунктирное подчеркивание – диапазон ингибирования роста.

На рисунке 3 представлены три чашки Петри с культурой клеток *S. aureus.* В первой чашке рост культуры клеток прекратился при концентрации Ампициллина 0.125 мг/мл. Во второй чашке (контроль растворителя ДМСО) рост наблюдался во всех лунках, что подтверждает отсутствие антимикробного влияния ДМСО. В третьей чашке рост культуры клеток прекратился при концентрации фитопрепарата – 10.42 мг/мл, которая была определена в качестве МБК фитопрепарата против *S. aureus*. Бактериостатический эффект фитопрепарата был выявлен в интервале 2.60-5.21 мг/мл, исходя из этого концентрация – 2.60 мг/мл была определена как МИК фитопрепарата против *S. aureus*.

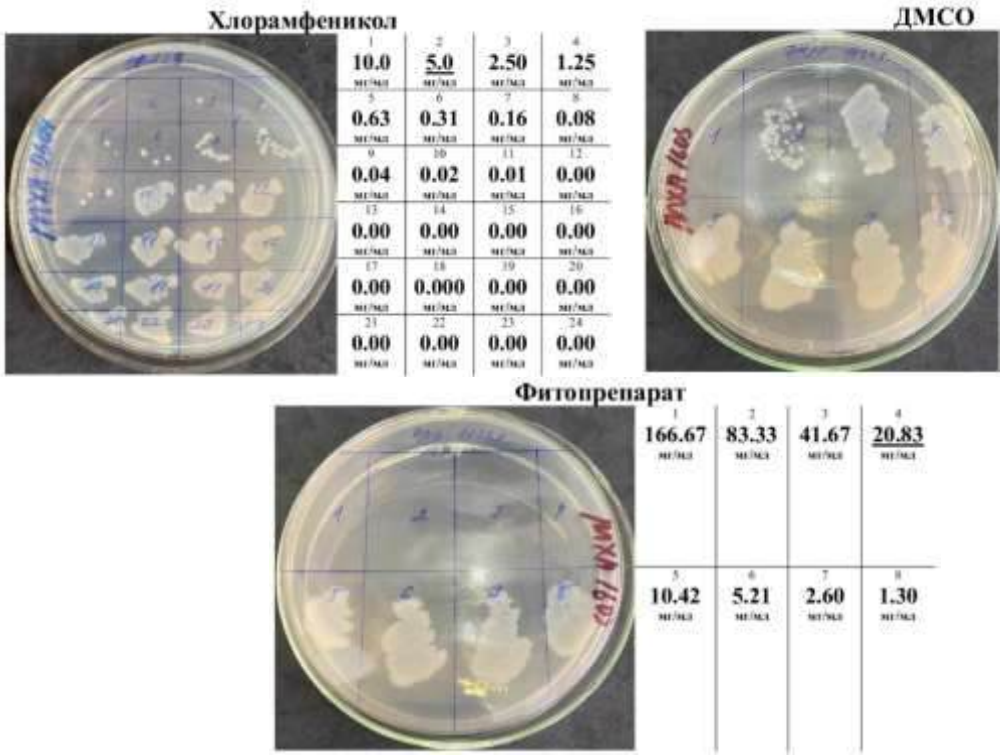


Рисунок 4 – Рост *E. coli* на питательной среде с добавлением Хлорамфеникола и фитопрепарата: линейное подчеркивание – МБК.

На рисунке 4 представлены три чашки Петри с культурой клеток *E. coli.* В первой чашке рост культуры клеток прекратился при концентрации Хлорамфеникола 5.0 мг/мл. Во второй чашке (контроль растворителя ДМСО) рост наблюдался во всех лунках, кроме первой; вероятно, это связано с локальной вариативностью эксперимента, поскольку во всех последующих лунках рост сохранялся, что подтверждает отсутствие существенного антимикробного влияния ДМСО. В третьей чашке рост культуры клеток прекратился при концентрации фитопрепарата – 20.83 мг/мл, которая была определена в качестве МБК фитопрепарата против *E. coli.* Бактериостатический эффект фитопрепарата не был выявлен, вследствие чего МИК фитопрепарата против *E. coli* определить не удалось.

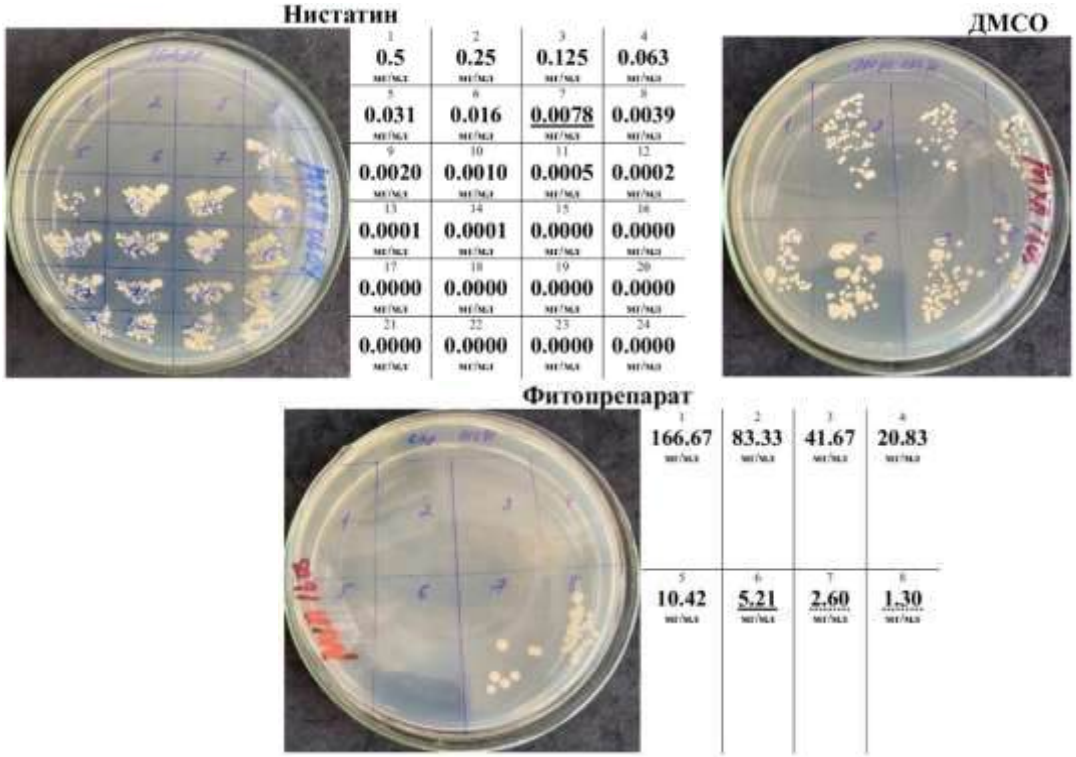


Рисунок 5 – Рост *C. albicans* на питательной среде с добавлением Нистатина и фитопрепарата: линейное подчеркивание – МФК; пунктирное подчеркивание – диапазон ингибирования роста.

На рисунке 5 представлены три чашки Петри с культурой клеток *C. albicans.* В первой чашке рост культуры клеток прекратился при концентрации Нистатина 0.0078 мг/мл. Во второй чашке (контроль растворителя ДМСО) рост наблюдался во всех лунках, кроме первой; вероятно, это связано с локальной вариативностью эксперимента, поскольку во всех последующих лунках рост сохранялся, что подтверждает отсутствие существенного антимикробного влияния ДМСО. В третьей чашке рост культуры клеток прекратился при концентрации фитопрепарата – 5.21 мг/мл, которая была определена в качестве МФК фитопрепарата против *C. albicans*. Фунгистатический эффект фитопрепарата был выявлен в интервале 1.30-2.60 мг/мл, исходя из этого концентрация – 1.30 мг/мл была определена как МИК фитопрепарата против *C. albicans*.

Результаты данного эксперимента были опубликованы [165].

Полученные данные свидетельствуют о более выраженной антимикробной активности фитопрепарата в отношении дрожжеподобных грибов – *C. albicans* и грамположительных бактерий – *S. aureus*, в сравнении с грамотрицательными бактериями – *E. coli.* Подобная закономерность широко описана в литературе и обусловлена особенностями строения клеточной оболочки микроорганизмов. Грамположительные бактерии обладают пептидогликановой стенкой без внешней мембраны, что облегчает проникновение липофильных и фенольных компонентов растительного происхождения [166]. В отличие от них, грамотрицательные бактерии, включая *E. coli,* имеют дополнительную внешнюю

мембрану, содержащую липополисахариды, которая выполняет барьерную функцию и ограничивает диффузию липофильных соединений, что проявляется снижением чувствительности к растительным экстрактам [167]. Фунгицидная активность в отношении *C. albicans* может быть связана со способностью растительных вторичных метаболитов нарушать целостность клеточной мембраны грибов путем взаимодействия с эргостеринами, ответственных за укрепление, стабильность и регуляцию проницаемости оболочки клеток, тем самым индуциируя их повреждение и гибель [168]. Подобные механизмы характерны для ряда фенольных соединений и терпенов, часто присутствующих в растительных экстрактах. Следует отметить, что значения МБК/МФК и МИК, полученные методом двукратных серийных разведений, отражают интервальную оценку активности, что соответствует рекомендациям Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) по интерпретации результатов микродилюционных тестов. Таким образом, фитопрепарат продемонстрировал преимущественную активность в отношении дрожжей и грамположительных бактерий, что согласуется с общими закономерностями чувствительности микроорганизмов к биологически активным веществам растительного происхождения.

3.4 Исследование острой и подострой токсичности фитопрепарата *in vivo*

3.4.1 Исследование острой токсичности фитопрепарата

За 14-ти дневный период наблюдения после однократного перорального введения фитопрепарата в дозах 2000 и 5000 мг/кг у животных не было обнаружено клинических признаков токсичности и гибели. Масса тела контрольных и опытных животных представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Масса тела мышей-самцов в контроле и при введении фитопрепарата (г), M±m

Период исследования	Контроль	ФТ 2000 мг/кг	ФТ 5000 мг/кг
День 0	29.2±2.0	28.5±2.2	29.0±2.2
День 7	31.7±1.9**	30.3±2.5**	31.0±2.6**
День 14	33.7±2.0***	32.5±2.3***	33.5±2.6***
Примечание: $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$ по сравнению с днем 0 (тест Даннета). Сокращения: ФТ – фитопрепарат.			

В результате двухфакторного дисперсионного анализа данных из таблицы 4 был определен статистически значимый эффект фактора периода исследования ($p < 0.001$-0.01), тогда как фактор введения фитопрепарата и его взаимодействие с фактором периода исследования статистически значимыми не были ($p = 0.7520$ и $p = 0.3016$ соответственно). Это свидетельствует о том, что изменение массы тела обусловлено естественным ростом животных и не связано с введением

фитопрепарата в дозах 2000 и 5000 мг/кг. При множественных сравнениях опытных групп с контрольной группой по Даннету статистически значимых различий между группами на дни 0, 7 и 14 не выявлено. К 7-му дню масса тела увеличилась на 6.6 % в контрольной группе, на 6.3 % в группе ФТ 2000 мг/кг и на 6.7 % в группе ФТ 5000 мг/кг по сравнению с исходным уровнем. К 14-му дню прирост составил 15.4 % в контроле, 14.9 % в группе ФТ 2000 мг/кг и 15.3 % в группе ФТ 5000 мг/кг. Эти данные подтверждают, что прирост массы тела носил физиологический характер и не зависел от введения исследуемого фитопрепарата.

После эвтаназии был проведен макроскопический осмотр и взвешивание внутренних органов животных. В результате были получены абсолютные массы внутренних органов, которые затем были использованы для расчета относительных масс, данные представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Относительная масса внутренних органов мышей-самцов в контроле и при введении фитопрепарата (%), M±m

Орган	Контроль	ФТ 2000 мг/кг	ФТ 5000 мг/кг
Сердце	0.51±0.01	0.53±0.03	0.53±0.03
Печень	5.08±0.10	5.18±0.21	5.24±0.24
Почки	1.21±0.07	1.30±0.03*	1.20±0.04
Селезенка	0.42±0.01	0.44±0.02	0.44±0.02
Легкие	0.72±0.02	0.73±0.03	0.74±0.05
Тимус	0.16±0.01	0.17±0.01	0.17±0.01
Примечание: *$p < 0.05$ по сравнению с контролем (тест Даннета). Сокращение: ФТ – фитопрепарат.			

В результате однофакторного дисперсионного анализа данных из таблицы 5 не было обнаружено статистически значимого эффекта введения фитопрепарата в дозах 2000 и 5000 мг/кг по сравнению с контрольной группой для сердца, печени, селезёнки, лёгких и тимуса ($p > 0.05$ для всех органов). Различия относительных масс данных органов относительно контроля были следующими: сердце 4-5 %, печень 2-3 %, селезёнка 4-6 %, лёгкие 2-3 % и тимус 4-8 %. Для почек был зафиксирован статистически значимый эффект введения фитопрепарата, обусловленный увеличением относительной массы в группе ФТ 2000 мг/кг по сравнению с контролем на 7% ($p = 0.0397$), тогда как в группе ФТ 5000 мг/кг достоверных изменений не наблюдалось ($p = 0.8716$). Выявленное увеличение относительной массы почек в группе ФТ 2000 мг/кг при отсутствии аналогичных изменений в группе ФТ 5000 мг/кг не демонстрирует дозозависимого характера и, вероятно, отражает адаптационно-компенсаторную реакцию почечной ткани. Отсутствие эффекта при более высокой дозе фитопрепарата (5000 мг/кг) может быть связано с нелинейным характером дозо-ответной зависимости (гормезисом), при котором умеренные дозы индуцируют более выраженный ответ по сравнению с высокими. Однако, почки являются

высокометаболически активным органом, чувствительным к изменениям водно-солевого баланса и метаболической нагрузки, что может сопровождаться умеренной функциональной гипертрофией без признаков структурного повреждения [169].

При макроскопическом осмотре внутренних органов животных были обнаружены следующие признаки: извлеченное сердце имеет типичное строение, при поперечном разрезе левый желудочек не увеличен; поверхность печени гладкая, лопасти без образований, однородной окраски, при поперечном разрезе каждой доли гистоархитектоника печени не изменена; почки типичные, поверхность блестящая, при продольном разрезе преобладает темное корковое вещество; легкие без уплотнений; селезенка во всех группах типичная, продолговатой формы, умеренно плотной консистенции. По причине того, что при макроскопическом исследовании не было обнаружено патологических изменении внутренних органов – гистологическое исследование не было проведено.

На основании отсутствия гибели животных, положительной динамики массы тела животных, результатов макроскопического исследования и относительных масс внутренних органов, а также в соответствии с классификацией Ходжа и Стернера был установлен VI класс токсичности исследуемого фитопрепарата, что позволяет отнести его к категории нетоксичных веществ (LD_{50} > 5000 мг/кг) [170].

3.4.2 Исследование подострой токсичности фитопрепарата

За 28-ми дневный период введения фитопрепарата животным не было обнаружено гибели. В таблице 6 приведены результаты наблюдения клинических признаков интоксикации экспериментальных животных.

Таблица 6 – Динамика проявления клинических симптомов интоксикации у мышей обоих полов в контроле и при введении фитопрепарата

Клинический симптом	Период исследования	Контроль		ФТ 200 мг/кг		ФТ 400 мг/кг	
		Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Норма	Неделя 1	5	4	4	5	5	4
	Неделя 2	5	5	5	5	5	5
	Неделя 3	5	5	5	5	5	5
	Неделя 4	5	5	5	5	5	5
Нескоординированность движений	Неделя 1	0	0	0	0	0	0
	Неделя 2	0	0	0	0	0	0
	Неделя 3	0	0	0	0	0	0
	Неделя 4	0	0	0	0	0	0
Изменение шерстного покрова	Неделя 1	0	0	0	0	0	0
	Неделя 2	0	0	0	0	0	0
	Неделя 3	0	0	0	0	0	0
	Неделя 4	0	0	0	0	0	0

Продолжение таблицы 6

Сбивание в кучу	Неделя 1	0	1	1	0	0	1
	Неделя 2	0	0	0	0	0	0
	Неделя 3	0	0	0	0	0	0
	Неделя 4	0	0	0	0	0	0
Жидкий стул	Неделя 1	0	0	0	0	0	0
	Неделя 2	0	0	0	0	0	0
	Неделя 3	0	0	0	0	0	0
	Неделя 4	0	0	0	0	0	0
Примечание: в ячейках указано количество животных с проявлением признака за неделю (от общего числа животных в подгруппе, n=5).							

Как видно из таблицы 6, в результате исследования динамики клинических симптомов интоксикации при введении фитопрепарата в дозах 200 мг/кг и 400 мг/кг на протяжении 28-ми дней регистрировалось кратковременное поведенческое проявление в виде сбивания в кучу (у 1 самки из контроля, 1 самца из группы ФТ 200 мг/кг и 1 самки из группы ФТ 400 мг/кг), что, вероятно, носило адаптационный характер. Начиная со второй недели и до конца периода наблюдения, общее состояние, двигательная активность, координация движений, состояние шерстного покрова и характер дефекации у животных всех экспериментальных групп соответствовали физиологической норме. Согласно критерию Фишера, межгрупповые различия по всем регистрируемым клиническим признакам на протяжении всего исследования статистически не значимы ($p > 0.05$) относительно контрольной группы соответствующего пола.

Для определения динамики массы тела, еженедельно в течение 28-ми дней проводилось взвешивание всех экспериментальных животных. Массы тела контроль и опытных животных представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Масса тела мышей обоих полов в контроле и при введении фитопрепарата (г), M±m

Период исследования	Контроль		ФТ 200 мг/кг		ФТ 400 мг/кг	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
День 0	30.0±1.6	27.6±1.6	30.4±1.5	27.3±1.5	30.1±1.6	27.5±1.4
День 7	31.6±1.6***	28.8±1.7**	31.9±1.4**	28.5±1.4**	31.6±1.3*	28.7±1.3**
День 14	32.8±1.2**	29.6±1.6***	32.9±1.3**	29.4±1.5**	32.8±1.4***	29.5±1.6**
День 21	34.0±1.0**	30.3±1.7***	34.4±0.9**	30.1±1.3***	34.0±0.8**	30.2±1.6**
День 28	34.8±1.0**	31.2±1.6***	35.1±0.9**	31.0±1.5***	34.9±0.8*	31.1±1.7**
Примечание: $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$ по сравнению с днем 0 (тест Даннета) Сокращения: ФТ – фитопрепарат.						

В результате двухфакторного дисперсионного анализа данных из таблицы 7 был определен статистически значимый эффект периода исследования на массу тела у самцов и самок ($p <0.05$-0.001) по тесту Даннетта). Однако не было обнаружено статистически значимого эффекта от введения фитопрепарата в дозах 200 и 400 мг/кг для самцов ($p = 0.9149$) и самок ($p = 0.9713$) по сравнению

с контрольной группой. Также взаимодействие факторов пола и введения фитопрепарата не было статистически значимым для самцов ($p = 0.9235$) и самок ($p = 0.7623$), что означает, что увеличение массы тела связано с естественным ростом и развитием животных, а не влиянием введения фитопрепарата в дозах 200 и 400 мг/кг [171] У самцов к 7-му дню масса тела увеличилась на 5.4 % в контрольной группе, на 4.9 % в группе ФТ 200 мг/кг и на 5.0 % в группе ФТ 400 мг/кг по сравнению с исходным уровнем; к 14-му дню прирост составил 9.2 % в контроле, 8.2 % в группе ФТ 200 мг/кг и 9.0 % в группе ФТ 400 мг/кг; к 21-му дню масса тела увеличилась на 13.3 % в контроле, 12.9 % в группе ФТ 200 мг/кг и 12.9 % в группе ФТ 400 мг/кг; к 28-му дню прирост составил 16.1 % в контроле, 15.2 % в группе ФТ 200 мг/кг и 15.7 % в группе ФТ 400 мг/кг. У самок к 7-му дню масса тела увеличилась на 4.4 % в контрольной группе, на 4.2 % в группе ФТ 200 мг/кг и на 4.1 % в группе ФТ 400 мг/кг по сравнению с исходным уровнем; к 14-му дню прирост составил 7.2 % в контроле, 7.7 % в группе ФТ 200 мг/кг и 7.3 % в группе ФТ 400 мг/кг; к 21-му дню масса тела увеличилась на 9.7 % в контроле, 10.3 % в группе ФТ 200 мг/кг и 9.8 % в группе ФТ 400 мг/кг; к 28-му дню прирост составил 13.2 % в контроле, 13.6 % в группе ФТ 200 мг/кг и 12.8 % в группе ФТ 400 мг/кг. При множественных сравнениях опытных групп с контрольной группой по тесту Даннетта статистически значимых различий между самцами и самками на дни 0, 7, 14, 21 и 28 не выявлено ($p > 0.05$). Эти результаты указывают на то, что увеличение массы тела происходило в физиологических пределах и не было связано с применением исследуемого фитопрепарата [172].

После эвтаназии было проведено макроскопическое исследование и взвешивание внутренних органов животных. В результате были получены абсолютные массы внутренних органов, которые затем были использованы для расчета относительных масс, данные представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Относительная масса внутренних органов мышей обоих полов в контроле и при введении фитопрепарата (%), M±m

Орган	Контроль		ФТ 200 мг/кг		ФТ 400 мг/кг	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Сердце	0.48±0.02	0.47±0.02	0.50±0.01*	0.45±0.03	0.49±0.02	0.46±0.03
Печень	4.70±0.16	5.05±0.19	4.75±0.13	5.01±0.16	4.74±0.13	5.03±0.19
Почки	1.20±0.06	1.12±0.11	1.23±0.03*	1.09±0.09	1.22±0.06*	1.10±0.10
Селезенка	0.40±0.03	0.38±0.03	0.41±0.02***	0.35±0.03	0.40±0.03	0.37±0.02
Легкие	0.66±0.04	0.66±0.02	0.69±0.02**	0.62±0.03	0.68±0.04	0.65±0.03
Тимус	0.15±0.02	0.14±0.01	0.16±0.01***	0.12±0.01	0.15±0.01**	0.12±0.02
Семенники	0.46±0.04	-	0.48±0.03	-	0.47±0.03	-
Яичники	-	0.07±0.00	-	0.07±0.00	-	0.07±0.00
Примечание: ***$p < 0.001$, **$p < 0.01$, *$p < 0.05$ по сравнению с самками той же группы (тест Бонферрони). Сокращения: ФТ – фитопрепарат.						

В результате двухфакторного дисперсионного анализа данных из таблицы 8 был определен статистический значимый эффект фактора пола: у самцов относительные массы сердца, почек, селезенки, легких и тимуса были выше по сравнению с самками ($p < 0.001$-0.05). Однако не было обнаружено статистически значимого эффекта от введения фитопрепарата в дозах 200 и 400 мг/кг для сердца ($p = 0.9597$), печени ($p = 0.9938$), почек ($p = 0.9965$), селезенки ($p = 0.7270$), легких ($p = 0.8470$) и тимуса ($p = 0.6514$) по сравнению с контрольной группой. Взаимодействие факторов пола и введения фитопрепарата также не были статистически значимыми (все $p > 0.05$). У самцов по сравнению с контролем относительная масса сердца была выше на 1.2 % в группе ФТ 200 мг/кг и на 0.8 % в группе ФТ 400 мг/кг; почек – на 0.7 % и 0.5 %; селезенки – на 1.0 % и 0.9 %; легких – на 0.6 % и 0.4 %; тимуса – на 1.1 % и 0.8 % соответственно. У самок по сравнению с контролем относительная масса печени была выше на 0.9 % и 1.0 %, а яичников – на 0.8 % и 0.7 % в группах ФТ 200 и 400 мг/кг соответственно. При множественных сравнениях опытных групп с контрольной группой по тесту Даннетта статистически значимых различий в относительной массе органов у животных обоих полов не выявлено ($p > 0.05$ для всех органов), что подтверждает отсутствие влияния фитопрепарата на органометрические показатели, а наблюдаемые различия связаны исключительно с половой принадлежностью животных [173].

При макроскопическом исследовании внутренних органов животных были обнаружены следующие признаки: мышцы сердца темно-красного цвета, однородные без повреждений и кровоизлияний; печень типичная, темно-красного цвета, с гладкой капсулой, на разрезе однородная, кровоизлияний или отложения жиров в паренхиме не выявлено; почки не деформированы, темно-коричневого цвета, при продольном разрезе корковое вещество преобладает над мозговым; селезенка темно-вишневого цвета, не изъязвленная, без признаков кровоизлияний; ткань легких воздушная, розовая, без признаков отека, кровоизлияний или некроза на разрезе; тимус мягкий и серовато-белого цвета; в репродуктивных органах патологий не выявлено, яичники типичны и семенники не увеличены.

Результаты гематологических исследовании крови животных представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Гематологические показатели мышей обоих полов в контроле и при введении фитопрепарата, M±m

Показатель	Контроль		ФТ 200 мг/кг		ФТ 400 мг/кг	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
RBC, 10^{12}/л	9.0±0.4	8.4±0.7	9.2±0.3**	8.1±0.4	9.0±0.3*	8.3±0.4
Hb, г/л	150.0±9.4	151.0±8.9	154.6±6.6	148.4±7.1	152.6±7.8	149.4±7.8
Hct, %	46.4±3.3	44.4±3.6	47.6±2.5	44.2±2.9	47.1±2.8	44.3±3.5
MCV, фл	55.2±3.3	55.0±3.5	56.4±2.6	54.0±3.3	55.8±2.9	54.7±3.5
MCH, пг	17.8±1.3	17.9±1.2	18.4±0.9	17.7±1.0	18.1±1.1	17.8±1.1
MCHC, г/л	338.0±12.5	336.8±13.3	341.2±10.8	333.6±13.2	339.8±11.9	335.2±12.9

Продолжение таблицы 9

WBC, 10^9/л	7.8±2.3	8.0±2.2	8.2±2.2	7.9±2.2	8.0±2.2	8.0±2.2
LYM, %	79.0±6.5	78.8±4.6	80.8±4.6	77.6±4.6	79.9±5.5	78.2±4.6
MON, %	5.1±1.0	5.2±0.7	5.5±0.7	5.1±0.7	5.3±1.0	5.2±0.6
GRA, %	24.8±4.0	24.8±3.6	26.2±4.0	23.8±3.6	25.6±4.0	24.4±3.3
PLT, 10^9/л	980.0±148.3	970.0±120.4	1040.0±138.7	952.0±117.3	992.0±142.0	962.0±102.9

Примечание: $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ по сравнению с самками той же группы (тест Бонферрони).
Сокращения: ФТ – фитопрепарат.
Обозначения: RBC – эритроциты, Hb – гемоглобин, Hct – гематокрит, MCV – средний объем эритроцитов, MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците, MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците, LYM – лимфоциты, MON – моноциты, GRA – гранулоциты, PLT – тромбоциты.

В результате двухфакторного дисперсионного анализа данных из таблицы 9 был определен статистический значимый эффект фактора пола: самцы имели более высокие значения RBC по сравнению с самками ($p < 0.05$-0.01). Однако не было обнаружено статистически значимого эффекта от введения фитопрепарата в дозах 200 и 400 мг/кг для RBC ($p = 0.9632$), Hb ($p = 0.9617$), Hct ($p = 0.9372$), MCV ($p = 0.9944$), MCH ($p = 0.9276$), MCHC ($p = 0.9998$), WBC ($p = 0.9895$), LYM ($p = 0.9915$), MON ($p = 0.9152$), GRA ($p = 0.9906$) и для PLT ($p = 0.9230$) по сравнению с контрольной группой. Взаимодействие факторов пола и введения фитопрепарата также не были статистически значимыми (все $p > 0.05$). У самцов RBC были выше на 0.2 % в группе ФТ 200 мг/кг и на 0.1 % в группе ФТ 400 мг/кг по сравнению с контролем; Hb – на 0.1 % и 0.05 %, Hct – на 0.3 % и 0.2 %, MCV – на 0.1 % и 0.05 %, MCH – на 0.2 % и 0.1 %, MCHC – на 0.05 % и 0.02 %, WBC – на 0.1 % и 0.05 %, LYM – на 0.1 % и 0.05 %, MON – на 0.05 % и 0.02 %, GRA – на 0.15 % и 0.08 %, PLT – на 0.8 % и 0.4 % соответственно. У самок RBC были ниже на 0.3 % и 0.1 %, Hb – на 0.2 % и 0.1 %, Hct – на 0.3 % и 0.2 %, MCV – на 0.2 % и 0.1 %, MCH – на 0.2 % и 0.1 %, MCHC – на 0.1 % и 0.05 %, WBC – на 0.1 % и 0.05 %, LYM – на 0.1 % и 0.05 %, MON – на 0.05 % и 0.02 %, GRA – на 0.15 % и 0.08 %, PLT – на 0.5 % и 0.2 % в группах ФТ 200 и 400 мг/кг соответственно. При множественных сравнениях опытных групп с контрольной группой по тесту Даннетта статистически значимых различий в гематологических показателях у животных обоих полов не выявлено ($p > 0.05$), что подтверждает отсутствие токсического влияния исследуемого фитопрепарата на гематологические показатели крови мышей, а наблюдаемые различия связаны исключительно с половой принадлежностью экспериментальных животных [174, 175].

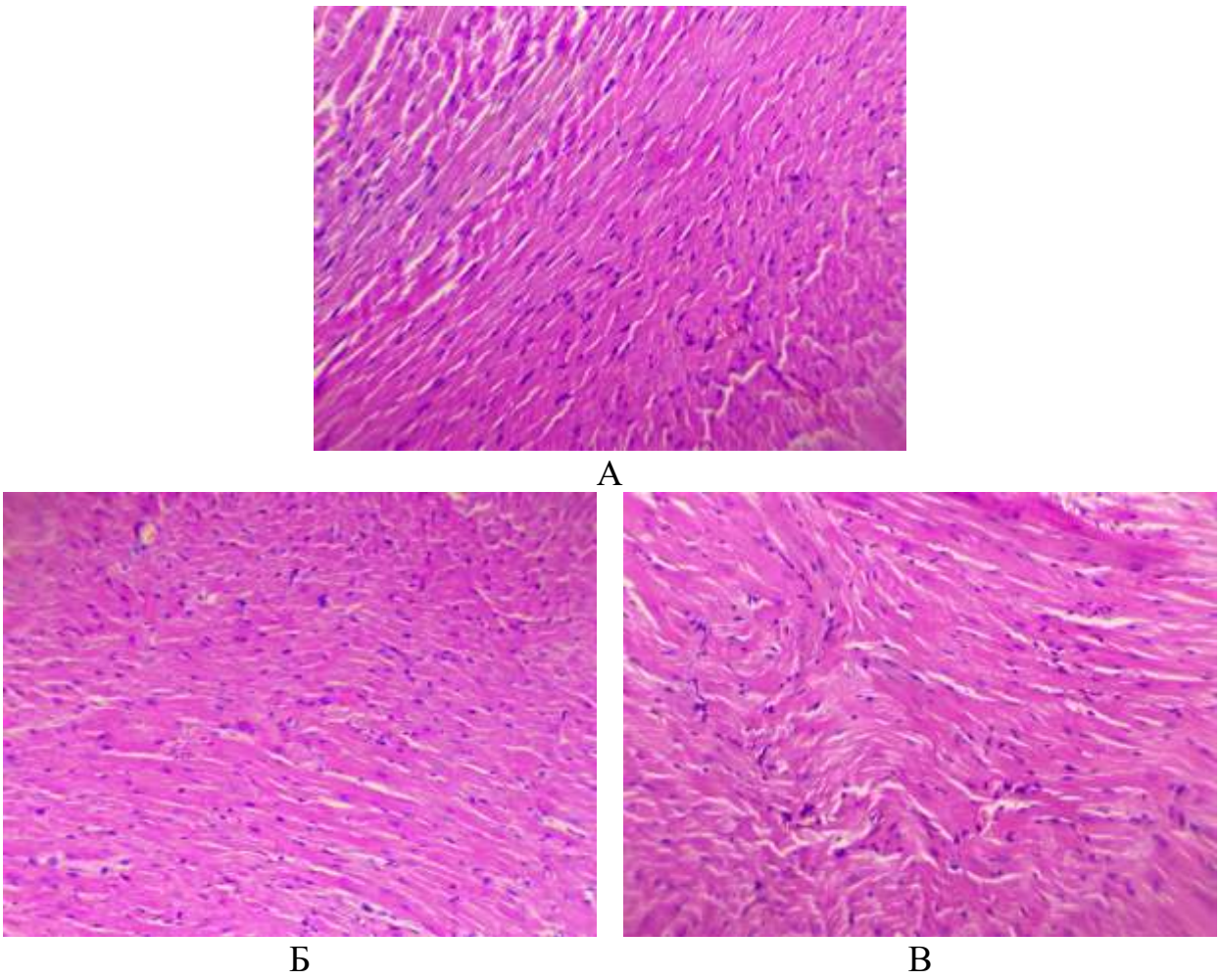
Результаты биохимических исследовании сыворотки крови животных представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Биохимические показатели сыворотки крови мышей обоих полов в контроле и при введении фитопрепарата, M±m

Показатель	Контроль		ФТ 200 мг/кг		ФТ 400 мг/кг	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
АЛТ, МЕ/л	49.4±6.5	44.1±6.7	49.6±6.5	43.6±6.8	49.5±6.4	43.9±6.8
АСТ, МЕ/л	104.0±11.0	97.0±6.7	104.6±11.2	96.4±6.8	104.4±11.4	96.8±6.9
Креатинин, мкмоль/л	25.2±3.5	21.4±3.1	25.6±3.7	20.9±3.1	25.5±3.5	21.5±3.1
Мочевина, ммоль/л	8.2±0.4	7.7±0.5	8.3±0.4*	7.6±0.5	8.2±0.4	7.7±0.5
ОБ, г/л	64.2±4.9	63.5±5.1	64.8±4.9	62.9±5.3	64.6±4.9	64.1±6.5
Примечание: *$p < 0.05$ по сравнению с самками той же группы (тест Бонферрони). Сокращения: ФТ – фитопрепарат. Обозначения: АЛТ – аланинаминотрансфераза, АСТ – аспартатаминотрансфераза, ОБ – общий белок.						

В результате двухфакторного дисперсионного анализа данных из таблицы 10 был выявлен статистический значимый эффект фактора пола: самцы имели более высокие значения мочевины ($p < 0.05$). Однако не было обнаружено статистически значимого эффекта от введения фитопрепарата в дозах 200 и 400 мг/кг для АЛТ ($p = 0.9988$), АСТ ($p = 0.9997$), креатинина ($p = 0.9809$), мочевины ($p = 0.9853$) и для ОБ ($p = 0.9728$) по сравнению с контрольной группой. Взаимодействие факторов пола и введения фитопрепарата также не были статистически значимыми (все $p > 0.05$). У самцов по сравнению с контролем АЛТ была выше на 0.22 % в группе ФТ 200 мг/кг и на 0.12 % в группе ФТ 400 мг/кг; АСТ – на 0.58 % и 0.42 %, креатинин – на 0.40 % и 0.34 %, мочевина – на 0.08 % и 0.02 %, ОБ – на 0.60 % и 0.36 % соответственно. У самок по сравнению с контролем АЛТ была ниже на 0.50 % и 0.20 %, АСТ – на 0.58 % и 0.24 %, креатинин – на 0.52 % и 0.10 %, мочевина – на 0.08 % и 0.08 %, ОБ – на 0.68 % и 0.56 % в группах ФТ 200 и 400 мг/кг соответственно. При множественных сравнениях опытных групп с контрольной группой по тесту Даннетта статистически значимых различий в биохимических показателях у животных обоих полов не выявлено ($p > 0.05$). Выявленные различия соответствуют установленным физиологическим диапазонам грызунов, где у самцов обычно наблюдаются более высокие исходные уровни биомаркеров печени и почек в сыворотке крови [176]. Следовательно отсутствие изменений, вызванных введением фитопрепарата, у самцов и самок согласуется с предыдущими исследованиями, где биохимические показатели находились в сопоставимых диапазонах после 28-дневного введения растительных экстрактов животным [177, 178].

Микроскопические фотографии сердца контрольных и опытных животных представлены на рисунке 6.



А

Б В

Рисунок 6 – Гистологическая структура сердца: А – контрольной группы, Б – группы ФТ 200 мг/кг, В – группы ФТ 400 мг/кг.
Увеличение: об. 20, ок. 10; окраска – гематоксилин-эозин

Как видно из рисунка 6 гистологическая структура сердца у контрольных (А) и опытных животных (Б, В) практически не отличались: миофибриллы сохраняли типичную поперечнополосатую исчерченность; кардиомиоциты характеризовались ядрами центральной локализации; строма органа без признаков отёка и фиброза.

Микроскопические фотографии печени контрольных и опытных животных представлены на рисунке 7.

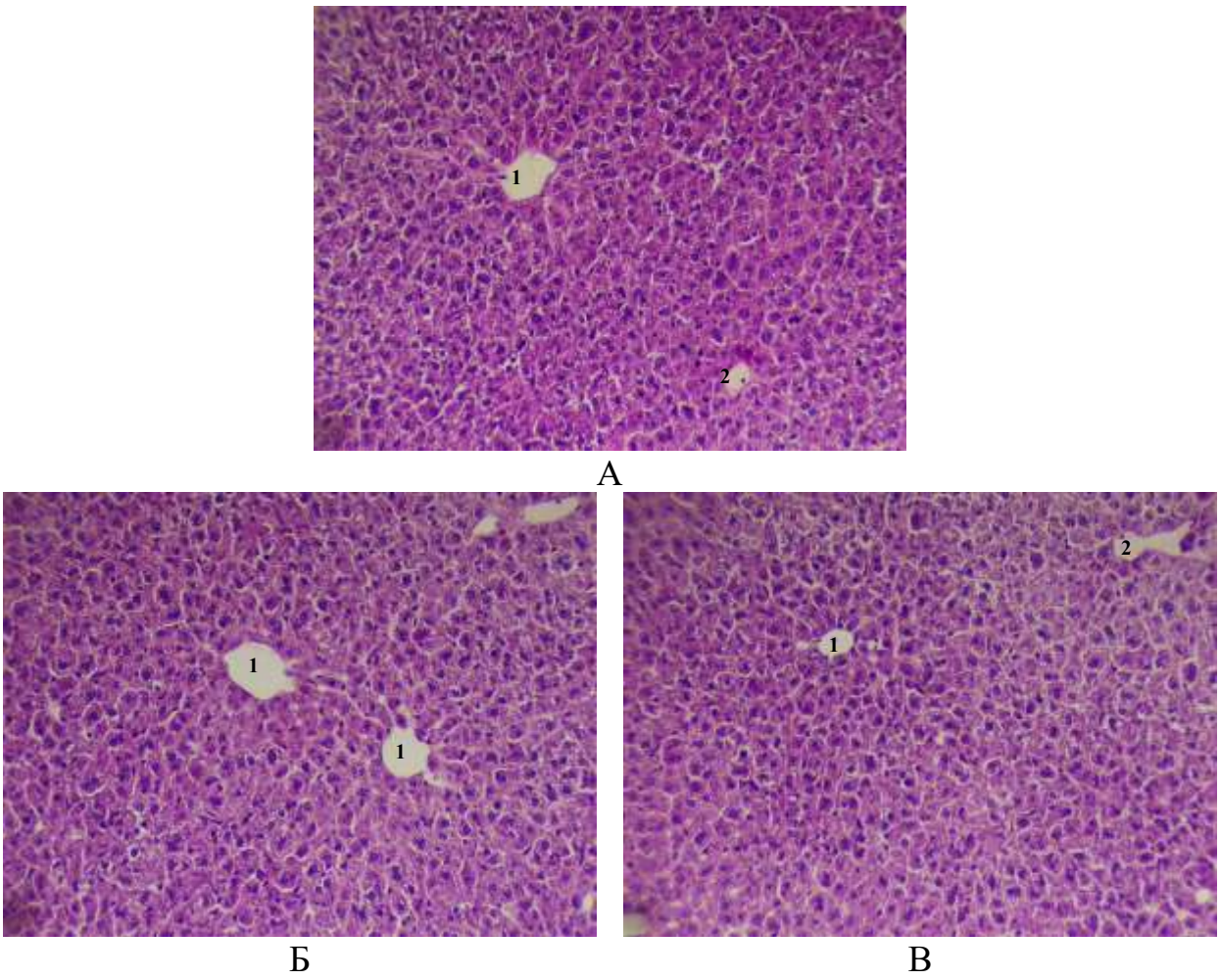
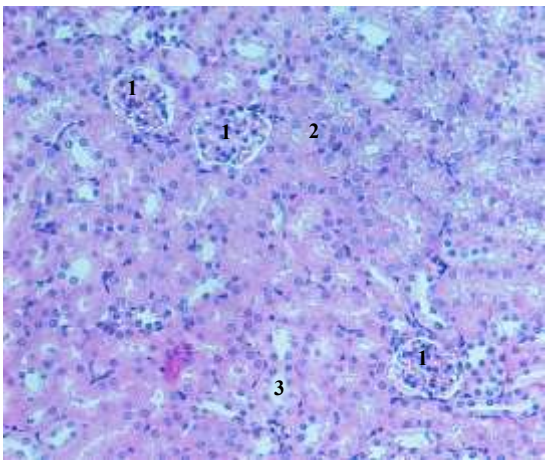


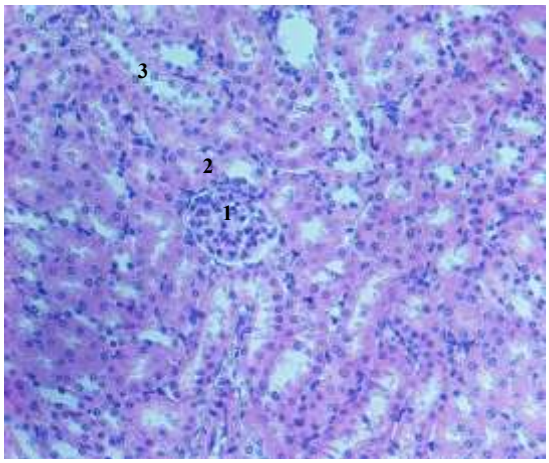
Рисунок 7 – Гистологическая структура печени: А – контрольной группы, Б – опытной группы ФТ 200 мг/кг, В – опытной группы ФТ 400 мг/кг; 1 – центральная вена, 2 – портальный тракт.
Увеличение: об. 20, ок. 10; окраска – гематоксилин-эозин

Как видно из рисунка 7 гистологическая структура печени у контрольных (А) и опытных животных (Б, В) практически не отличались: печеночные балки сохраняли радиальное расположение к центральной вене; гепатоциты имели полигональную форму с центрально расположенным ядром, местами обнаруживались двуядерные гепатоциты; сосудистые нарушения (стаз, полнокровие) отсутствовали; клетки Купфера были без признаков активизации.

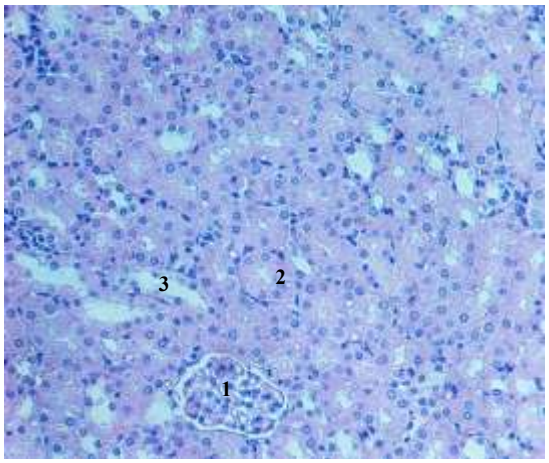
Микроскопические фотографии почек контрольных и опытных животных представлены на рисунке 8.



А



Б

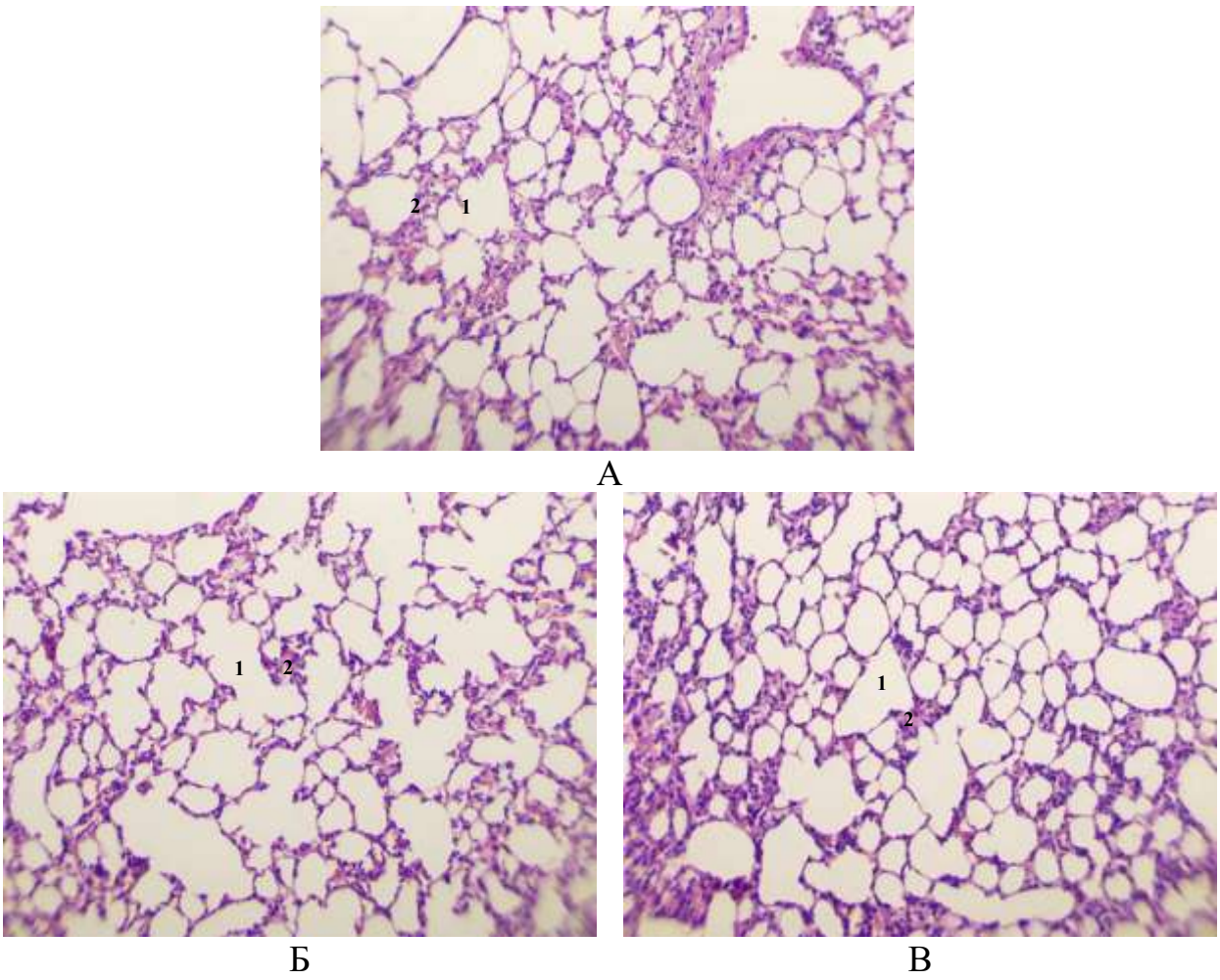


В

Рисунок 8 – Гистологическая структура почек: А – контрольной группы, Б – группы ФТ 200 мг/кг, В – группы ФТ 400 мг/кг; 1 – почечный клубочек, 2 – проксимальный каналец, 3 – дистальный каналец.
Увеличение: об. 20, ок. 10; окраска – гематоксилин-эозин

Как видно из рисунка 8 гистологическая структура почек у контрольных (А) и опытных животных (Б, В) практически не отличались: в корковом веществе сосудистые клубочки распределялись равномерно, боуменово пространство не расширено; просветы извитых канальцев без белковых экссудатов; проксимальные канальцы представлены высоким призматическим эпителием; дистальные канальца выстланы низким кубическим эпителием.

Микроскопические фотографии легких контрольных и опытных животных представлены на рисунке 9.



А

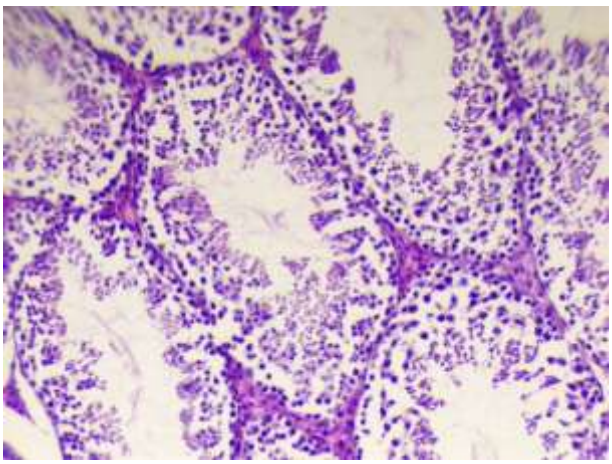
Б

В

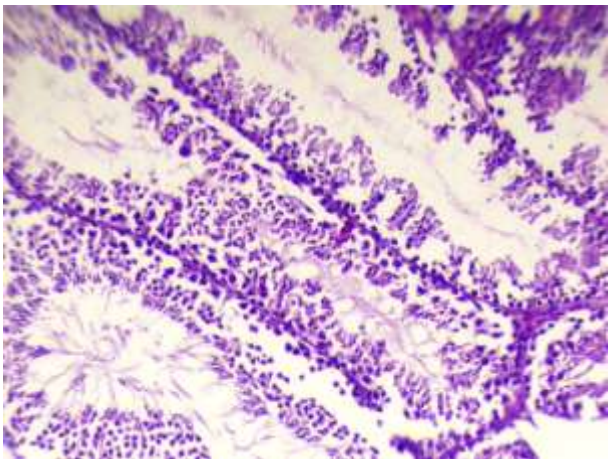
Рисунок 9 – Гистологическая структура легких: А – контрольной группы, Б – группы ФТ 200 мг/кг, В – группы ФТ 400 мг/кг; 1 – альвеолы, 2 – альвеолярная стенка.
Увеличение: об. 20, ок. 10; окраска – гематоксилин-эозин

Как видно из рисунка 9 гистологическая структура легких у контрольных (А) и опытных животных (Б, В) практически не отличались: воздушность паренхимы сохранена, без признаков выраженного отека и инфильтрации; альвеолы разделены узкими межальвеолярными перегородками, стенки без признаков утолщения или фиброза.

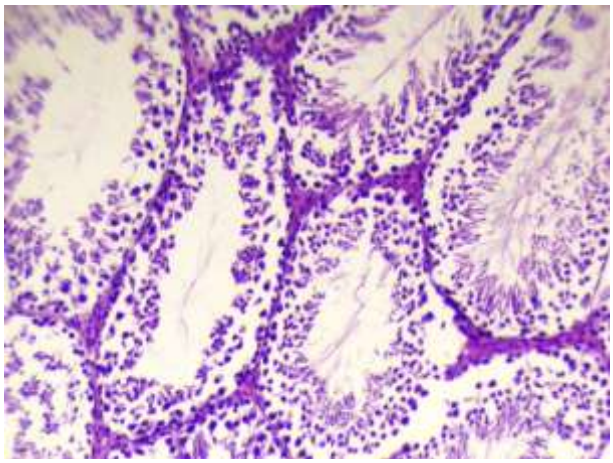
Микроскопические фотографии семенников контрольных и опытных животных представлены на рисунках 10.



А



Б

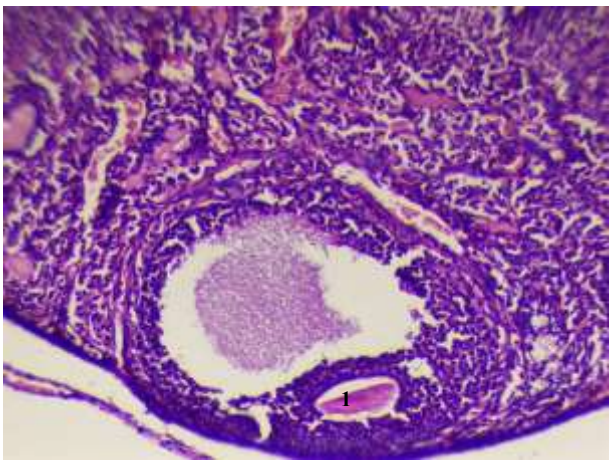


В

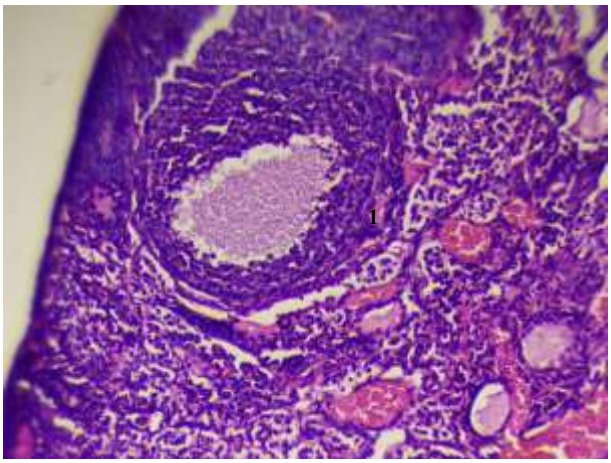
Рисунок 10 – Гистологическая структура семенников: А – контрольной группы, Б – группы ФТ 200 мг/кг, В – группы ФТ 400 мг/кг. Увеличение: об. 20, ок. 10; окраска – гематоксилин-эозин

Как видно из рисунка 10 гистологическая структура семенников у контрольных (А) и опытных животных (Б, В) практически не отличались: семенные канальцы круглой или овальной формы, эпителий канальцев состоит из упорядоченных клеток сперматогенной линии с наличием сперматозоидов в просвете; признаков некроза или воспаления не выявлено.

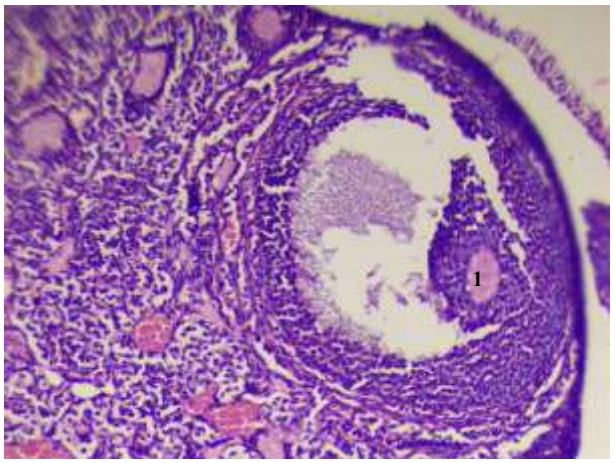
Микроскопические фотографии яичников контрольных и опытных животных представлены на рисунке 11.



А



Б



В

Рисунок 11 – Гистологическая структура яичников: А – контрольной группы, Б – группы ФТ 200 мг/кг, В – группы ФТ 400 мг/кг; 1 – овоцит. Увеличение: об. 20, ок. 10; окраска – гематоксилин-эозин

Как видно из рисунка 11 гистологическая структура яичников у контрольных (А) и опытных животных (Б, В) практически не отличались: строма яичника представлена рыхлой волокнистой соединительной тканью с кровеносными сосудами; в корковом веществе обнаруживается фолликул с овоцитом, окружённый слоями гранулёзных клеток.

Полученные результаты исследований острой и подострой токсичности фитопрепарата на мышах были опубликованы [179].

По результатам 28-дневного перорального введения ФТ в дозах 200 и 400 мг/кг не выявлено отрицательного влияния на общее состояние животных, динамику массы тела и относительные массы внутренних органов. Отсутствие межгрупповых различий по данным показателям свидетельствует об отсутствии системного токсического действия и органоспецифических эффектов, что соответствует общепринятым критериям оценки подострой токсичности [180, 181]. Выявленные половые различия гематологических и биохимических параметров (более высокие значения эритроцитов и мочевины у самцов по сравнению с самками) могут отражать физиологический половой диморфизм у

грызунов и не связаны с воздействием исследуемого фитопрепарата [182] При этом фитопрепарат в дозах 200 и 400 мг/кг не вызывал статистически значимых изменений гематологических показателей, что свидетельствует об отсутствии гематотоксичности и согласуется с данными исследований растительных экстрактов при многократном введении животным [183]. Стабильность биохимических маркеров функции печени и почек (АЛТ, АСТ, креатинин, мочевина, ОБ), а также отсутствие макроскопических и гистопатологических изменений в исследованных органах подтверждают морфофункциональную сохранность тканей. Совокупность полученных результатов соответствует критериям оценки безопасности исследования 28-ми дневного подострого эксперимента в соответствии с протоколом OECD №407 и позволяет заключить, что исследуемый фитопрепарат не проявляет признаков органоспецифической токсичности при многократном введении в дозах до 400 мг/кг.

3.5 Исследование эффективности фитопрепарата при метаболическом синдроме

Моделирование метаболических нарушений было подтверждено промежуточными данными саттелитной группы животных. Так, масса тела мышей на 8-й неделе высокоуглеводного рациона составила 29.8 ± 1.5 г, что статистически значимо превышало исходный показатель 20.7 ± 1.1 г на 44% ($p < 0.05$), свидетельствуя об избыточном приросте массы тела. Уровень глюкозы в крови натощак составил 5.9 ± 0.4 ммоль/л в сравнении с исходным показателем 4.3 ± 0.3 ммоль/л на 37.2 % ($p < 0.01$). Развитие дислипидемии подтверждалось статистически значимым ростом триглицеридов (ТГ) на 36% до 0.95 ± 0.1 ммоль/л ($p < 0.01$) и общего холестерина (ОХ) на 42% до 3.4 ± 0.3 ммоль/л ($p < 0.01$), в сравнении с верхними границами референсных значений для ТГ 0.4 – 0.7 ммоль/л и 1.8 – 2.4 для ОХ [184]. Полученные данные послужили основанием для введения фитопрепарата в дозах 50, 200 и 400 мг/кг.

После 14-ти недель исследования (8 недель высокоуглеводного рациона и 6 недель введения фитопрепарата) были проведены эвтаназия и взвешивание животных контрольной и опытных групп. Массы тела мышей и относительные массы висцерального жира, печени и почек представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Масса тела и относительные массы органов мышей-самцов, M±m

Показатель	Контроль	МС	МС+ФТ 50 мг/кг	МС+ФТ 200 мг/кг	МС+ФТ 400 мг/кг
Масса тела, г	27.5±1.0	$35.1\pm2.5^{###}$	$30.1\pm1.5^{*}$	$28.0\pm1.3^{***}$	$27.5\pm1.0^{***}$
Висцеральный жир, %	2.2±0.0	$4.6\pm0.0^{##}$	$4.1\pm0.0^{*}$	$2.7\pm0.0^{***}$	$2.5\pm0.0^{***}$
Печень, %	3.4±0.0	$4.2\pm0.0^{###}$	4.0±0.0	$3.8\pm0.0^{*}$	$3.4\pm0.1^{**}$
Почки, %	1.3±0.0	$1.7\pm0.0^{##}$	1.6±0.0	$1.4\pm0.0^{**}$	$1.3\pm0.0^{***}$
Примечание: $^{###}p < 0.001$, $^{##}p < 0.01$ по сравнению с контролем и $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$ по сравнению с группой МС (тест Даннета). Сокращения: МС – метаболический синдром, ФТ – фитопрепарат.					

В результате однофакторного дисперсионного анализа данных из таблицы 11 была выявлена статистически значимая разница между показателями массы тела, относительных масс висцерального жира, печени и почек контрольной группы по сравнению с моделью метаболического синдрома (группа МС, $p < 0.001$-0.01); однако был обнаружен статистически значимый эффект от введения фитопрепарата на данные показатели ($p < 0.001$-0.05). При множественных сравнениях групп ФТ с группой МС по Даннету было установлено, что фитопрепарат снижал прирост массы тела, накопление висцерального жира, массы печени и почек в дозозависимой манере, приближая данные показатели к уровню контроля. Таким образом масса тела животных в группе МС увеличилась на 28% по сравнению с контролем, а введение фитопрепарата снижало этот прирост дозозависимо – на 14% при 50 мг/кг, на 20 % при 200 мг/кг и на 22% при 400 мг/кг. Висцеральный жир у животных в группе МС увеличился более чем в два раза относительно контроля, а фитопрепарат снижал его накопление на 11%, 40% и 46% при дозах 50, 200 и 400 мг/кг соответственно. Масса печени у животных с МС повышалась на 25%, однако снижалась при введении фитопрепарата на 5%, на 9% и 19% при 50, 200 и 400 мг/кг. Масса почек при МС увеличивалась на 33% и не имела статистически значимой разницы с дозой ФТ 50 мг/кг; однако уменьшалась на 18% при дозе ФТ 200/кг и на 25% при дозе ФТ 400 мг/кг. Данные результаты подтверждают выраженное метаболическое влияние МС, проявляющееся в увеличении массы тела, висцерального жира и массы органов, и демонстрируют потенциал фитопрепарата уменьшать данные изменения в дозозависимой манере. Также полученные данные согласуются с современными обзорами, демонстрирующими, что растительные экстракты и содержащиеся в них биологически активные соединения могут благоприятно влиять на ключевые компоненты МС, предотвращая избыточный прирост массы тела и накопление висцерального жира [185, 186].

Результаты биохимических исследовании сыворотки крови животных представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Биохимические показатели сыворотки крови мышей-самцов, M±m

Показатель	Контроль	МС	МС+ФТ 50 мг/кг	МС+ФТ 200 мг/кг	МС+ФТ 400 мг/кг
АЛТ, МЕ/л	31.4±5.0	$61.4±9.0^{###}$	50.9±11.6	$43.8±7.8^{*}$	$39.0±6.9^{**}$
АСТ, МЕ/л	20.9±1.0	$50.7±0.8^{###}$	$42.4±1.5^{*}$	$39.5±1.1^{**}$	$34.9±0.9^{***}$
ОХ, ммоль/л	2.2±0.2	$4.2±0.4^{###}$	3.9±0.5	$3.5±0.3^{*}$	$3.2±0.3^{**}$
ТГ, ммоль/л	0.7±0.1	$1.1±0.1^{###}$	1.0±0.1	$0.8±0.1^{*}$	$0.8±0.1^{**}$
ЛПВП, ммоль/л	2.8±0.3	$1.0±0.1^{###}$	$1.5±0.2^{*}$	$2.2±0.3^{**}$	$2.4±0.3^{***}$
ЛПНП, ммоль/л	1.5±0.1	$2.2±0.3^{###}$	$1.7±0.3^{*}$	$1.5±0.2^{**}$	$1.4±0.2^{***}$
Глюкоза, ммоль/л	4.1±0.3	$6.6±0.7^{###}$	5.9±0.7	$4.7±0.7^{**}$	$4.4±0.6^{***}$
Инсулин, мкМЕ/мл	9.8±1.4	$24.6±2.9^{###}$	$20.8±2.4^{*}$	$15.4±1.8^{***}$	$12.1±1.8^{***}$

Продолжение таблицы 12

HOMA-IR	1.8±0.3	7.2±0.9$^{###}$	5.5±0.7**	3.2±0.4***	2.4±0.4***
Примечание: $^{###}p < 0.001$, $^{##}p < 0.01$ по сравнению с контролем и $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$ по сравнению с группой МС (тест Даннета). Сокращения: МС – метаболический синдром, ФТ – фитопрепарат. Обозначения: АЛТ – аланинаминотрансфераза, АСТ – аспартатаминотрансфераза, ОХ – общий холестерин, ТГ – триглицериды, ЛПВП – липопротеины высокой плотности, ЛПНП – липопротеины низкой плотности, HOMA-IR — индекс инсулинорезистентности.					

В результате однофакторного дисперсионного анализа данных из таблицы 12 была выявлена статистически значимая разница в показателях печёночной и почечной функции, а также липидного и углеводного профиля сыворотки крови контрольной группы по сравнению с моделью метаболического синдрома (группа МС, $p < 0.001$-0.01). Однако был обнаружен статистически значимый эффект от введения фитопрепарата на данные показатели ($p < 0.001$-0.05). При множественных сравнениях групп ФТ с группой МС по Даннету было установлено, что введение фитопрепарата снижало повышенные уровни АЛТ и АСТ, ОХ и ТГ, а также нормализовало липопротеины и содержание глюкозы, инсулина и индекса инсулинорезистентности (HOMA-IR) в дозозависимой тенденции, приближая данные показатели к уровню контроля. Так, концентрация АЛТ при МС увеличилась в два раза по сравнению с контролем, а введение фитопрепарата в дозах 200 и 400 мг/кг снижало данный показатель на 29% и 36%, соответственно. При дозе ФТ 50 мг/кг уровень АЛТ снижался на 17%, но не достоверно. Концентрация АСТ у животных с МС возросла почти в 2.5 раза по сравнению с контролем, а введение фитопрепарата статистически значимо снижало данный показатель на 16% при дозе 50 мг/кг, на 22% при 200 мг/кг и на 31% при 400 мг/кг. Уровень триглицеридов при МС был повышен на 58% и не имел статистически значимой разницы с дозой ФТ 50 мг/кг; однако данный показатель снижался при введении фитопрепарата в дозах 200 и 400 мг/кг на 26% соответсвенно. Концентрация общего холестерина увеличивалась на 96 % у животных с МС, а введение фитопрепарата снижало данный показатель на 18% при дозе 200 мг/кг и на 24.5% при дозе 400 мг/кг. Содержание ЛПВП при МС уменьшилось на 65.5 % по сравнению с контролем, тогда как введение фитопрепарата повышала уровень ЛПВП на 49% при дозе 50 мг/кг, на 129% при 200 мг/кг и на 145% при 400 мг/кг. Также у животных с МС уровень ЛПНП повышался на 49% относительно контроля, а под действием фитопрепарата отмечено снижение ЛПНП на 22% при дозе 50 мг/кг, на 31% при 200 мг/кг и на 36% при 400 мг/кг. Уровень глюкозы в крови при МС был повышен на 60% по сравнению с контролем и не имел статистически значимой разницы с дозой ФТ 50 мг/кг; однако данный показатель снижался при введении фитопрепарата на 29% при 200 мг/кг и на 33% при 400 мг/кг. Концентрация инсулина при МС увеличивалась более чем в 2.5 раза по сравнению с контролем. Введение фитопрепарата приводило к достоверному снижению уровня данного гормона во

всех исследованных дозах: на 15.5% при 50 мг/кг, на 37.5% при 200 мг/кг и на 50.6% при 400 мг/кг по сравнению с группой МС. Индекс HOMA-IR при метаболическом синдроме увеличивался почти в 4 раза по сравнению с контролем. Под действием фитопрепарата показатель снижался на 24% при дозе 50 мг/кг, на 55% при 200 мг/кг и на 66.6% при 400 мг/кг, что свидетельствует об уменьшении выраженности инсулинорезистентности. Полученные результаты подтверждают нарушение обмена веществ при метаболическом синдроме, проявляющееся повреждением функции печени, дислипидемией и инсулинорезистентностью [187-189]. Дозозависимая нормализация уровня печеночных трансаминаз, улучшение липидного профиля, восстановление чувствительности клеток и тканей к инсулина на фоне введения фитопрепарата в дозах 200 и 400 мг/кг свидетельствуют об его инсулинсенсибилизирующем и липидкорригирующем действии.

Результаты биохимического исследования были подтверждены микрофотографиями печени животных контрольных и опытных групп, представленных на рисунках 12-16.

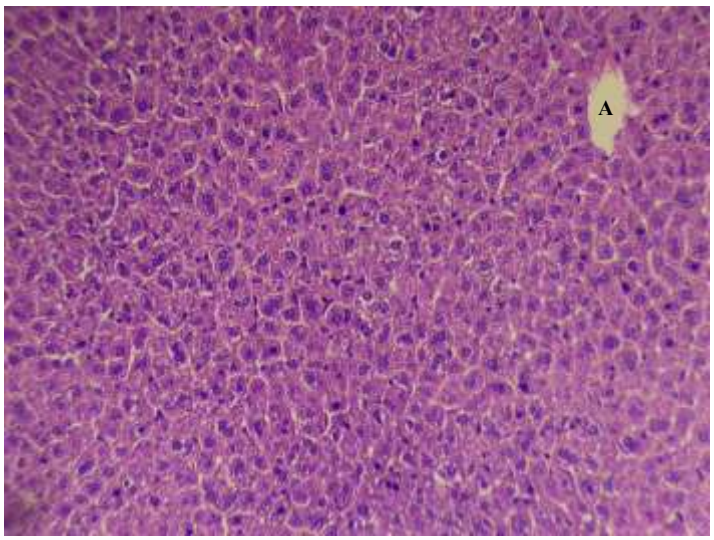


Рисунок 12 – Гистологическая структура печени контрольной группы: А – центральная вена.
Увеличение: об. 20, ок. 10; окраска – гематоксилин-эозин

Как видно из рисунка 12, гистологическая структура печени животных контрольной группы была следующей: дольчатая архитектоника сохранена, печёночные тяжи ориентированы радиально к центральной вене; гепатоциты полигональной формы с эозинофильной цитоплазмой; ядра гепатоцитов округлые, центрально расположенные; между печёночными тяжами обнаруживаются синусоидные капилляры, просветы их сохранены; признаков жировой дистрофии, клеточной инфильтрации и некробиоза не обнаружено.

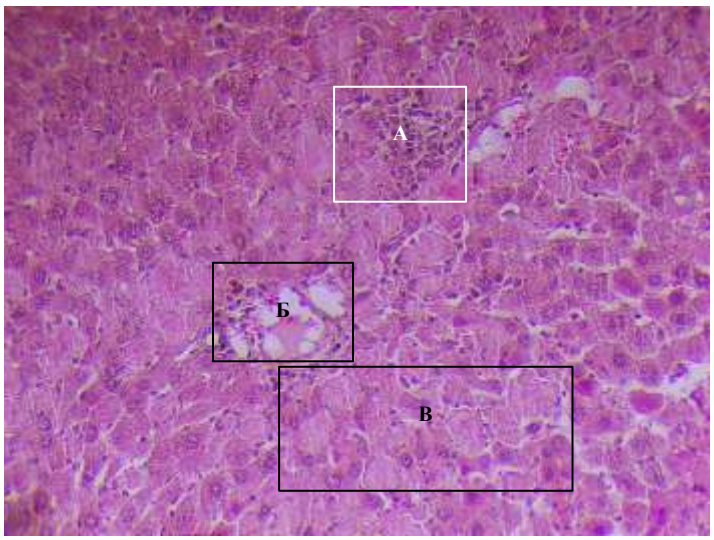


Рисунок 13 – Гистологическая структура печени группы МС:
А – клеточная инфильтрация, Б – мелкопельная жировая дистрофия,
В – гепатоциты с гомогенно-окрашенной цитоплазмой (некробиоз).
Увеличение: об. 20, ок. 10; окраска – гематоксилин-эозин

Как видно из рисунка 13, гистологическая структура печени животных группы с моделью метаболического синдрома была следующей: печеночные тяжи дезорганизованы; местами обнаруживаются крупные с гомогенно-окрашенной цитоплазмой гепатоциты со смещением ядер к периферии, что соответствует признакам мелкокапельной жировой дистрофии и некробиозу; синусоиды и перисинусоидальное пространство (Диссе) умеренно расширены; в портальных зонах обнаруживается клеточная инфильтрация. Морфологическая картина соответствует модели метаболического синдрома [190].

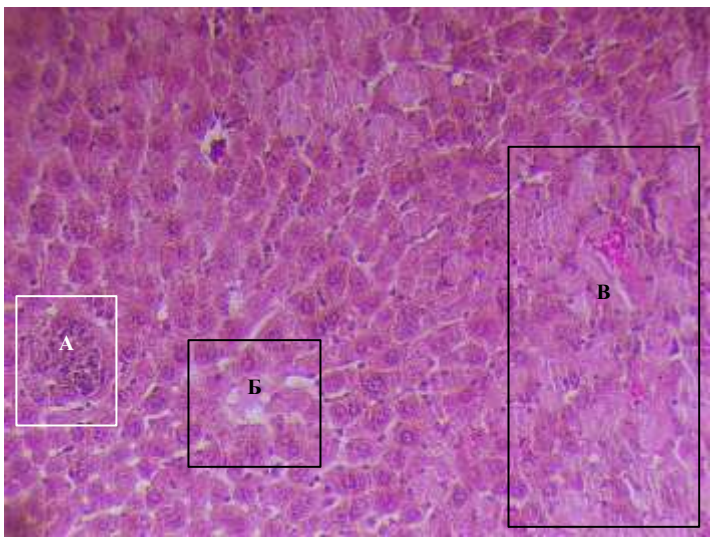


Рисунок 14 – Гистологическая структура печени группы МС + ФТ 50 мг/кг:
А – клеточная инфильтрация, Б – мелкопельная жировая дистрофия,
В – некробиоз гепатоцитов.
Увеличение: об. 20, ок. 10; окраска – гематоксилин-эозин

Как видно из рисунка 14, гистологическая структура печени животных с моделью метаболического синдрома, получавших фитопрепарат в дозе 50 мг/кг была следующей: дольковая архитектоника в целом прослеживается, но встречается дезорганизация печеночных тжей; гепатоциты преимущественно увеличены, цитоплазма эозинофильная, местами с просветлением; ядра в основном центрально расположены, но в отдельных клетках отмечаются мелкие вакуоли без смещения ядра к периферии; признаков массивного некробиоза не выявляется, однако обнаруживается клеточныйинфильтрат; синусоиды умеренно расширены, местами содержат эритроциты.

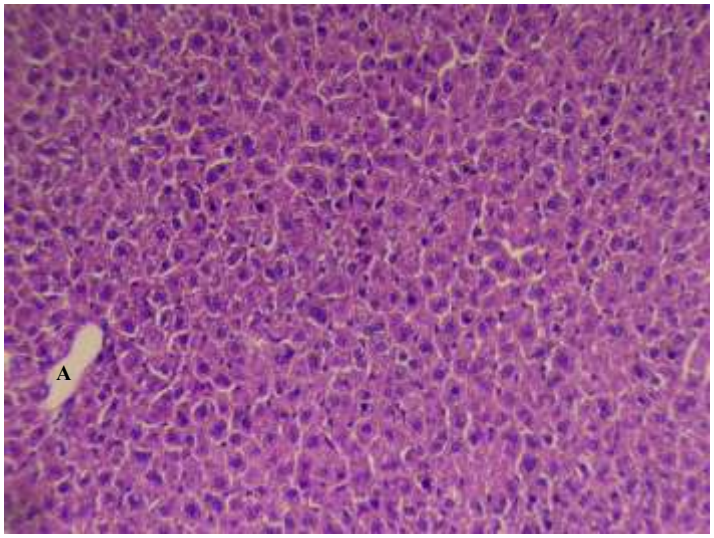


Рисунок 15 – Гистологическая структура печени группы МС + ФТ 200 мг/кг: А – центральная вена.
Увеличение: об. 20, ок. 10; окраска – гематоксилин-эозин

Как видно из рисунка 15, гистологическая структура печени животных группы с моделью метаболического синдрома, получавших фитопрепарат в дозе 200 мг/кг была следующей: дольковая архитектоника в целом сохранена, печеночные тяжи располагаются упорядоченно; гепатоциты полигональной формы с эозинофильной, местами зернистой цитоплазмой; ядра округлые, центрально расположенные; клеточной инфильтрации, признаков жировой дистрофии и некробиоза гепатоцитов не выявлено.

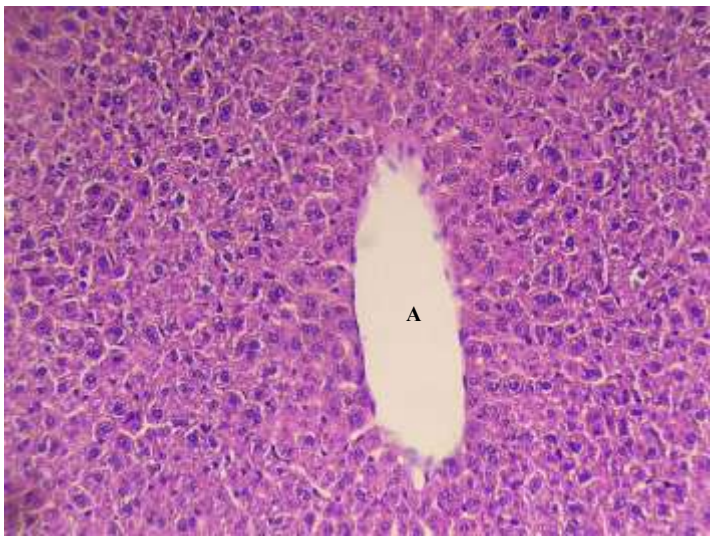


Рисунок 16 – Гистологическая структура печени группы МС + ФТ 400 мг/кг: А – центральная вена.
Увеличение: об. 20, ок. 10; окраска – гематоксилин-эозин

Как видно из рисунка 16, гистологическая структура печени животных группы с моделью метаболического синдрома, получавших фитопрепарат в дозе 400 мг/кг была следующей: архитектоника долек сохранена, печеночные тяжи расположены радиально к центральной вене; гепатоциты преимущественно полигональной формы, не увеличены; цитоплазма эозинофильная, местами зернистая; ядра округлые, центрально расположенные; синусоиды не расширены, полнокровия не обнаружено; стеатоза со смещением ядра к периферии клетки не выявлено; клеточная инфильтрация отсутствует.

Таким образом, путем органометрического, биохимического и гистологического исследований на фоне введения фитопрепарата в дозах до 400 мг/кг было установлено его метаболическое действие. Все результаты данного эксперимента были опубликованы [191].

Нормализация углеводного и липидного обменов на фоне введения исследуемого фитопрепарата может носить системный многокомпонентный характер. На организменном уровне углеводный баланс может быть обусловлен ингибированием активности α-амилазы и α-глюкозидазы – ключевых ферментов, участвующих в гидролизе полисахаридов в тонком кишечнике [192]. Ведущую роль в ограничении распада углеводов до простых сахаров и предотвращении резких постпрандиальных пиков глюкозы может играть кверцетин-3-О-галактозид (гиперозид) [193]. Дополнительный вклад в данный процесс может вносить обнаруженная в составе фитопрепарата хлорогеновая кислота, способная подавлять активность натрий-глюкозного котранспортера 1-го типа (SGLT-1), ответственного за всасывание моносахаридов в энтероцитах. Поддержание стабильного пула циркулирующей глюкозы предотвращает развитие компенсаторной гиперинсулинемии и сопутствующей инсулинорезистентности [194].

На молекулярно-клеточном уровне метаболический эффект фитопрепарата может быть обусловлен модуляцией сигнальных путей. Центральным медиатором липидкорригирующего действия фитопрепарата может выступать сигнальный путь АМФК (АМФ-активируемой протеинкиназы), прямая активация которого ассоциирована с регуляторным эффектом лютеолина-7-О-глюкозида, акацетина-7-О-глюкозида и хлорогеновой кислоты [195]. Дополнительный вклад в этот процесс вносит мирицетин, который стимулирует 6-фосфоглюконатдегидрогеназу, регулирующую пул НАДФН и окислительно-восстановительный баланс, что синергично индуцирует регуляторную активность АМФК [196]. Активированная АМФК переводит клеточный метаболизм в катаболический режим, подавляя пути *de novo* липогенеза и холестериногенеза в гепатоцитах, повышенная экспрессия которых индуцирована инсулинорезистентностью. Важным звеном данного процесса является направленная супрессия активности синтазы жирных кислот (FAS) и стимуляция их β-окисления под действием акацетина-7-О-глюкозида и лютеолина-7-О-глюкозида [197]. Блокирование данного сигнального пути предотвращает избыточное накопление триглицеридов в тканях и снижает липотоксиность в отношении печени, предотвращая развитие метаболического синдрома [198].

Наряду с нормализацией липидного обмена, БАС фитопрепарата способны реактивировать гормональный путь IRS-1/PI3K/Akt. Восстановление активности данного сигнального пути стимулирует внутриклеточные механизмы транслокации глюкозных транспортеров (в частности, GLUT-4) к цитоплазматической мембране скелетных мышц и жировой ткани [199]. Синергичная активация сигнальных путей АМФК и IRS-1/PI3K/Akt обеспечивает восстановление чувствительности клеток и периферических тканей к инсулину – тем самым ускоряя утилизацию избытка глюкозы, из системного кровотока, что приводит к нормализации уровня глюкозы в крови [200].

Помимо сигнальных путей, описанных выше, нормализация липидного профиля может быть осуществлена через экстрагепатический механизм действия хлорогеновой кислоты, а именно его способность ингибировать активность панкреатической липазы. Супрессия данного фермента поджелудочной железы ограничивает распад триглицеридов, поступающих вместе с пищей на свободные жирные кислоты, что снижает их последующую абсорбцию энтероцитами тонкого кишечника и предотвращает алиментарную перегрузку липидами [201]. Гепатопротекторный эффект фитопрепарата может быть обусловлен направленным ингибированием ключевых ферментов анаболизма липидов. В частности, под действием акацетина-7-О-глюкозида и лютеолина-7-О-глюкозида может происходить ингибирование гидроксиметилглутарил-кофермент А редуктазы (ГМГ-КоА-редуктазы) – ключевого звена гиполипидемической терапии, что может обосновать снижение уровня ЛПНП в сыворотке крови мышей [202].

Важнейшую роль в модуляции метаболизма жирных кислот играет также ацетил-КоА-карбоксилаза, инактивация которой происходит опосредованно через описанный выше сигнальный путь АМФК, запускаемый акацетином, лютеолином и мирицетином. Торможение активности ацетил-КоА-карбоксилазы блокирует начальные этапы липогенеза, приводя к выраженному снижению пула триглицеридов и свободных жирных кислот в гепатоцитах, что обосновывает метаболическую эффективность фитопрепарата в отношении МАЖБП [203].

3.6 Исследование эффективности фитопрепарата при CCl_4-гепатотоксичности

До окончания данного эксперимента отсутствовала гибель животных. После 6 недель введения CCl_4 и фитопрепарата в дозах 50, 200 и 400 мг/кг была проведена эвтаназия мышей с последующим взятием крови для исследования биохимических показателей сыворотки крови.

Результаты исследования биохимических показателей сыворотки крови мышей, получавших CCl_4 и фитопрепарат в дозах: 50, 200 и 400 мг/кг, представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Биохимические показатели сыворотки крови мышей-самцов, M±m

Показатель	Контроль	CCl_4	CCl_4+ФТ 50 мг/кг	CCl_4+ФТ 200 мг/кг	CCl_4+ФТ 400 мг/кг
АЛТ, МЕ/л	70.8±3.3	$150.6\pm11.0^{\#\#\#}$	149.7±10.4	$83.6\pm4.9^{***}$	$80.8\pm3.4^{***}$
АСТ, МЕ/л	251.8±27.9	$563.0\pm33.5^{\#\#\#}$	$500.0\pm24.2^{*}$	$305.1\pm31.3^{***}$	$302.7\pm26.1^{***}$
ГГТ, МЕ/л	12.5±1.5	$36.1\pm2.2^{\#\#\#}$	34.0±3.2	$25.9\pm2.0^{**}$	$19.7\pm2.0^{***}$
ОБ, г/л	62.2±3.3	$91.6\pm5.9^{\#\#\#}$	87.1±5.0	$71.3\pm8.6^{**}$	$65.4\pm3.8^{***}$
Альбумин, г/л	30.5±1.2	$22.3\pm0.6^{\#\#\#}$	23.0±0.9	$26.7\pm1.0^{**}$	$29.4\pm1.2^{***}$

Примечание: $^{\#\#\#}p < 0.001$ по сравнению с контролем и $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$ по сравнению с группой CCl_4 (тест Даннета).
Сокращения: CCl_4 – модель гепатотоксичности, ФТ – фитопрепарат.
Обозначения: АЛТ – аланинаминотрансфераза, АСТ – аспартатаминотрансфераза, ГГТ – гамма-глутамилтранспептидаза, ОБ – общий белок.

В результате однофакторного дисперсионного анализа данных из таблицы 13 была выявлена статистически значимая разница между показателями печёночной и почечной функции, а также показателей белоксинтетической активности контрольной группы по сравнению с моделью гепатотоксичности (группа CCl_4, $p < 0.001$-0.05); однако был обнаружен статистически значимый эффект от введения фитопрепарата на данные показатели ($p < 0.001$-0.05). При множественных сравнениях групп ФТ с группой CCl_4 по Даннету было установлено, что введение фитопрепарата снижало повышенные уровни АЛТ, АСТ, ГГТ, а также нормализовало уровни общего белка и альбумина в дозозависимой манере приближая данные показатели к уровню контроля. Таким образом, концентрация АЛТ при интоксикации CCl_4 увеличилась на 112.7% по сравнению с контролем. Введение фитопрепарата в дозе 50 мг/кг снижала

данный показатель на 0.6%, но различия были статистически незначимыми. Однако при дозах 200 и 400 мг/кг концентрация АЛТ уменьшалась на 44.5% и 46.3% соответственно. Уровень АСТ у животных, получавших CCl_4, возрос на 123.6 % по сравнению с контролем, а введение фитопрепарата снижало данный показатель на 11.2 % при дозе 50 мг/кг, на 45.8% при 200 мг/кг и на 46.2% при 400 мг/кг. Активность ГГТ при интоксикации CCl_4 увеличилась на 189.4% относительно контроля. При дозе 50 мг/кг уровень ГГТ снижался на 5.7%, однако различия не достигали статистической значимости. Введение фитопрепарата в дозах 200 и 400 мг/кг уменьшала активность ГГТ на 28.3% и 45.4% соответственно. Концентрация общего белка в группе CCl_4 повышалась на 32.1% по сравнению с контролем. На фоне введения фитопрепарата уровень общего белка снижался на 4.9% при дозе 50 мг/кг, на 22.2% при 200 мг/кг и на 28.6% при 400 мг/кг. Содержание альбумина при интоксикации CCl_4 без введения фитопрепарата уменьшилось на 27 % относительно контроля. При дозе ФТ 50 мг/кг концентрация альбумина повышалась на 3%, но различия были статистически незначимыми. Однако при введении фитопрепарата в дозах 200 и 400 мг/кг уровень альбумина увеличивался на 20% и 32% соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о гепатотоксическом действии CCl_4, сопровождающемся повышением активности печёночных ферментов и снижением белковосинтетической функции печени [204]. Введение фитопрепарата способствовало дозозависимой нормализации данных показателей, что указывает на его способность восстанавливать функциональную активность гепатоцитоы [205].

Результаты исследования маркеров окислительного стресса представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Активность ферментных комплексов печени мышей-самцов, M±m

Показатель	Контроль	CCl_4	CCl_4+ФТ 50 мг/кг	CCl_4+ФТ 200 мг/кг	CCl_4+ФТ 400 мг/кг
СОД, мМЕ/г	78.0±2.6	$37.5±3.0^{###}$	40.0±0.9	$44.3±3.0^{*}$	$54.1±4.4^{***}$
КАТ, мкмоль/мин/г	27.3±2.1	$8.9±0.9^{###}$	11.4±1.0	$14.4±1.0^{**}$	$14.9±1.0^{***}$
ГП, мМЕ/г	16.7±1.2	$6.8±0.7^{###}$	7.1±1.0	$9.8±0.6^{**}$	$10.6±1.1^{***}$
МДА, нмоль/г	181.9±10.1	$715.5±61.5^{###}$	669.5±52.1	$523.8±29.1^{**}$	$467.4±21.6^{***}$

Примечание: $^{###}p < 0.001$ по сравнению с контролем и $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$ по сравнению с группой CCl_4 (тест Даннета).
Сокращения: CCl_4 – модель гепатотоксичности, ФТ – фитопрепарат.
Обозначения: СОД – супероксиддисмутаза, КАТ – каталаза, ГП – глутатион пероксидаза, МДА – малоновый диальдегид.

В результате однофакторного дисперсионного анализа данных из таблицы 14 была выявлена статистически значимая разница между показателями активности ферментных комплексов печени контрольной группы по сравнению с моделью гепатотоксичности (группа CCl_4, $p < 0.001$); однако был обнаружен статистически значимый эффект от введения фитопрепарата на данные показатели ($p < 0.001$-0.05). При множественных сравнениях групп ФТ с группой

CCl_4 по Даннету было установлено, что введение фитопрепарата повышало сниженную активность ферментов СОД, КАТ, ГП и снижало повышенный уровень МДА и приближая данные показатели к уровню контроля. Так, содержание восстановленного глутатиона при интоксикации CCl_4 снижалось на 59.2% по сравнению с контролем. При дозе 50 мг/кг уровень ГП повышался на 5.0%, однако различия не достигали статистической значимости. Введение фитопрепарата в дозах 200 и 400 мг/кг сопровождалось увеличением концентрации ГП на 43.8% и 55.9% соответственно по сравнению с группой CCl_4. Активность каталазы в группе CCl_4 снижалась на 67.6% относительно контроля. На фоне введения фитопрепарата отмечалось повышение активности КАТ на 28.2% при дозе 50 мг/кг, на 62.1% при 200 мг/кг и на 68.4% при 400 мг/кг по сравнению с группой CCl_4. Аналогичная динамика выявлена для СОД: при введении CCl_4 без введения фитопрепарата активность фермента уменьшалась на 51.9% по сравнению с контролем. Введение фитопрепарата в дозе 50 мг/кг повышала активность СОД на 6.7%, но различия были статистически незначимыми, однако при дозах 200 и 400 мг/кг данный показатель увеличивался на 18.1% и 44.1% соответственно относительно группы CCl_4. Уровень МДА увеличивался при интоксикации CCl_4 в 3.9 раза по сравнению с контролем, что отражает выраженную активацию процессов перекисного окисления липидов. При введении фитопрепарата в дозе 50 мг/кг содержание МДА снижалось на 6.4%, однако различия не достигали статистической значимости. Введение фитопрепарата в дозах 200 и 400 мг/кг приводило к снижению уровня МДА на 26.8% и 34.7% соответственно по сравнению с группой CCl_4. В совокупности полученные результаты свидетельствуют о способности фитопрепарата восстанавливать антиоксидантное звено защиты и снижать интенсивность перекисного окисления липидов ослаблять CCl_4-индуцированный оксидативный стресс за счёт подавления перекисного окисления липидов, что подтверждает его антиоксидантный эффект [206, 207].

Результаты биохимического анализа были подтверждены визуальными наблюдениями гистологической структуры печени контрольных и опытных животных, представленной на рисунках 17-21.

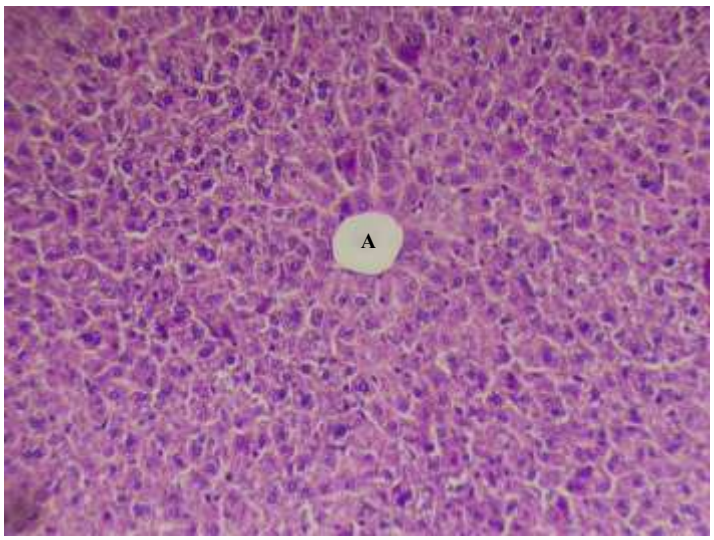


Рисунок 17 – Гистоструктура печени контрольной группы: А – центральная вена.Увеличение: об. 20, ок. 10; окраска – гематоксилин-эозин.

Как видно из рисунка 17, гистологическая структура печени контрольной группы соответствует норме: дольковая архитектоника полностью сохранена; от центральной вены радиальными рядами расходятся тяжи гепатоцитов преимущественно полигональной формы с чёткими контурами и округлыми, центрально расположенные ядрами; цитоплазма эозинофильная, без признаков вакуолизации; воспалительных инфильтратов не обнаружено; синусоиды не расширены, без полнокровия и стаза; некротических изменений не обнаруживается; морфологическая картина соответствует печени без признаков токсического повреждения.

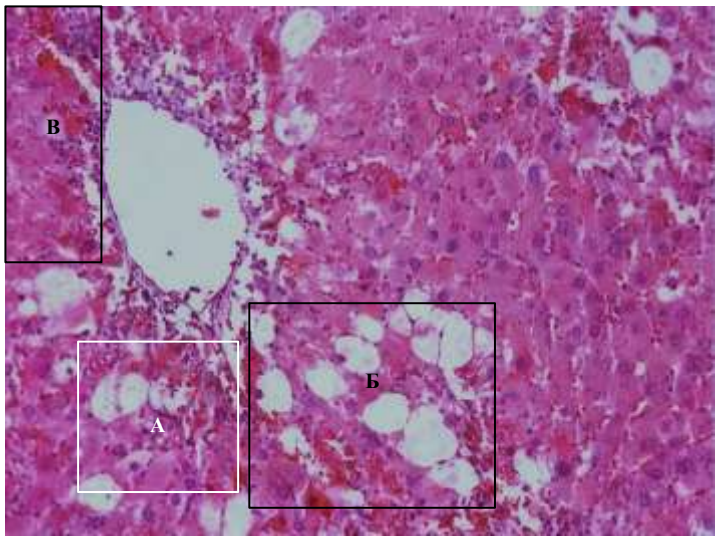


Рисунок 18 – Гистоструктура печени группы с моделью CCl_4-гепатотоксичности: А – воспалительно-клеточный инфильтрат, Б – крупнокапельная жировая дистрофия, В – гепатоциты с гомогенно-окрашенной цитоплазмой и кариопикнозом/кариорексисом (некроз). Увеличение: об. 20, ок. 10; окраска – гематоксилин-эозин

Как видно из рисунка 18, гистологическая структура печени животных группы с моделью CCl_4-гепатотоксичности не получавших фитопрепарат была следующей: балочная архитектоника долек нарушена; гепатоциты увеличены в размерах, цитоплазма вакуолизирована; обнаруживается мелкокапельная и крупнокапельная жировая дистрофия со смещением ядер к периферии; синусоиды расширены, полнокровны, местами с признаками стаза; также обнаруживается воспалительная инфильтрация и очаговый некроз. Обнаруженные изменения гистологической структуры печени соответствуют морфологии токсического поражения на фоне введения CCl_4 [208].

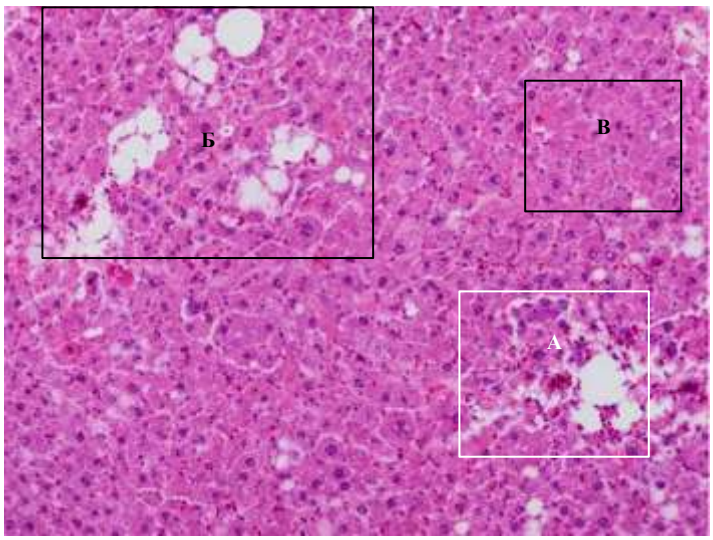


Рисунок 19 – Гистоструктура печени группы CCl_4 + ФТ 50 мг/кг: А – воспалительно-клеточный инфильтрат, Б – крупнокапельная жировая дистрофия, В – некроз гепатоцитов.
Увеличение: об. 20, ок. 10; окраска – гематоксилин-эозин

Как видно из рисунка 19, гистологическая структура печени животных группы с моделью CCl_4-гепатотоксичности получавших фитопрепарат в дозе 50 мг/кг была следующей: отмечается дезорганизация печеночных балок и мелкокапельная и крупнокапельная жировая дистрофия; синусоиды расширены, эритроциты присутствуют; отмечаются участки некротических изменений; в синусоидальных трактах обнаруживается воспалительная инфильтрация.

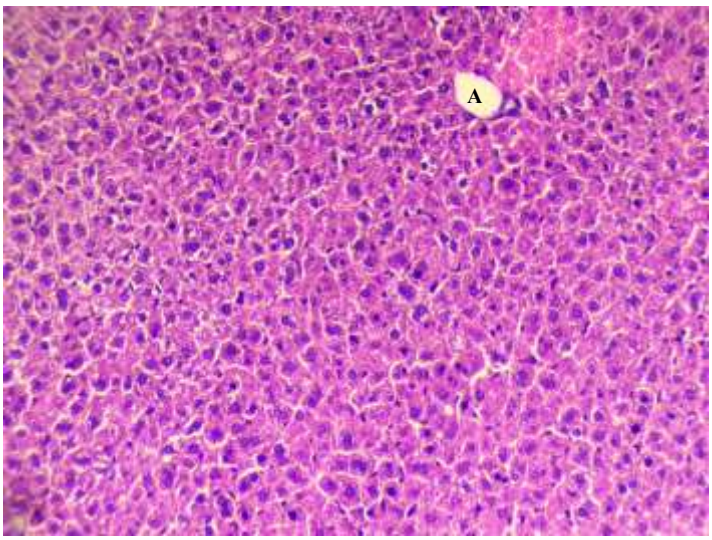


Рисунок 20 – Гистоструктура печени группы CCl_4 + ФТ 200 мг/кг:
А – центральная вена. Увеличение: об. 20, ок. 10; окраска – гематоксилин-эозин

Как видно из рисунка 20, гистологическая структура печени животных группы с моделью CCl_4-гепатотоксичности получавших фитопрепарат в дозе 200 мг/кг была следующей: дольковая архитектоника сохранена, от центральной вены радиальными рядами расходятся печёночные тяжи; гепатоциты преимущественно полигональной формы с центрально расположенными ядрами и зернистой цитоплазмой без признаков вакуолизации; дистрофически измененных гепатоцитов и воспалительных инфильтратов нет; стаза и полнокровия синусоидов не выявлено.

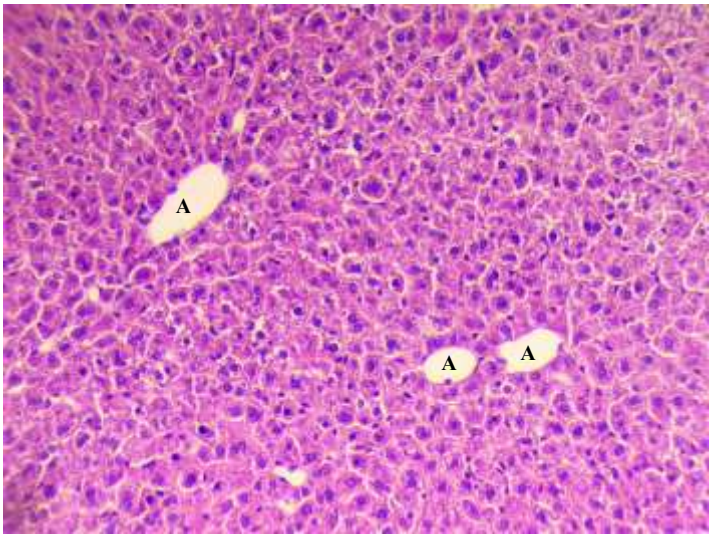


Рисунок 21 – Гистоструктура печени группы CCl_4 + ФТ 400:
А – центральная вена. Увеличение: об. 20, ок. 10; окраска – гематоксилин-эозин

Как видно из рисунка 21, гистологическая структура печени животных группы с моделью CCl_4-гепатотоксичности получавших фитопрепарат в дозе 400 мг/кг была следующей: сохранены дольковая архитектоника и радиальное положение печеночных тяжей; гепатоциты полигональной формы с центрально расположенными ядрами и эозинофильной цитоплазмой; воспалительных инфильтратов не обнаружено; синусоиды без признаков стаза и полнокровия.

Гистологическое исследование было подтверждено морфометрическим анализом. Результаты представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Морфометрические параметры печени мышей-самцов, M±m

Показатель	Контроль	CCl_4	CCl_4+ФТ 50 мг/кг	CCl_4+ФТ 200 мг/кг	CCl_4+ФТ 400 мг/кг
Интактные гепатоциты, %	94.90±2.10	$14.70±1.80^{###}$	18.60±5.00	$67.00±7.20^{**}$	$83.90±2.50^{***}$
Гепатоциты с жировой дистрофией, %	3.10±0.30	$30.80±3.70^{###}$	27.80±4.20	$10.60±3.00^{**}$	$4.20±1.00^{***}$
Гепатоциты с некрозом, %	2.00±0.20	$19.70±2.90^{###}$	17.40±4.20	$7.50±2.70^{**}$	$3.90±0.70^{***}$
Примечание: $^{###}p < 0.001$ по сравнению с контролем и $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$ по сравнению с группой CCl_4 (тест Даннета). Сокращения: CCl_4 – модель гепатотоксичности, ФТ – фитопрепарат.					

В результате однофакторного дисперсионного анализа данных из таблицы 15 была выявлена статистически значимая разница между морфометрическими параметрами печени контрольной группы по сравнению с моделью гепатотоксичности (группа CCl_4, $p < 0.001$); однако был обнаружен статистически значимый эффект от введения фитопрепарата на данные показатели ($p < 0.001$-0.05). При множественных сравнениях групп ФТ с группой CCl_4 по Даннету было установлено, что интоксикация CCl_4 сопровождалась выраженными деструктивными и компенсаторными морфологическими изменениями печени, тогда как введение фитопрепарата способствовало их дозозависимой регрессии. Доля интактных гепатоцитов при интоксикации CCl_4 снижалась в 6.5 раза относительно контроля. Введение фитопрепарата приводило к увеличению данного показателя по сравнению с группой CCl_4 в 1.3 раза при дозе 50 мг/кг, в 4.6 раза при 200 мг/кг и в 5.7 раза при 400 мг/кг. Гепатоциты с жировой дистрофией при интоксикации CCl_4 увеличивались почти в 10 раз относительно контроля. Введение фитопрепарата приводило к снижению данного показателя по сравнению с CCl_4 в 1.1 раза при дозе 50 мг/кг, в 2.9 раза при 200 мг/кг и в 7 раз при 400 мг/кг. Процентное соотношение гепатоцитов с некрозом при воздействии CCl_4 увеличивалось в 10 раз относительно контроля. Введение фитопрепарата снижало данный показатель по сравнению с CCl_4 в 1.1 раза при 50 мг/кг, в 2.6 раза при 200 мг/кг и в 5 раз при 400 мг/кг. Таким образом, морфометрические данные подтверждают токсическое воздействие CCl_4 на паренхиму печени и свидетельствуют о дозозависимом гепатопротекторном эффекте фитопрепарата, проявляющимся в

сохранении структурно-функциональной организации гепатоцитов, предотвращении жировой дистрофии и некроза, а также в сохранении пула интактных гепатоцитов. Результаты морфометрических исследований взаимноподтверждены результатами гистологического исследования печени.

Результаты данного исследования (включающие 4-х и 6-недельные эксперименты) были предварительно опубликованы в материалах статьи [209]. Ввиду отсутствия статистически значимых различий между указанными временными точками, в настоящий текст диссертации включены исключительно итоговые данные 6-недельного эксперимента. Данный подход позволил обеспечить единообразие длительности этапов для исследуемых моделей эффективности фитопрепарата из корня *Arctium tomentosum* Mill.

Полученные результаты согласуются с результатами ряда исследований, где были описаны гепатопротекторные эффекты растительных экстрактов. Присутствие полифенольных метаболитов являлось ключевым основанием их антиоксидантного действия и сопутствующей стабилизации клеточных мембран гепатоцитов, что может приводить к снижению интенсивности окислительного стресса и активации регенеративных процессов в печеночной ткани [210-212].

Способность фитопрепарата нейтрализовывать свободные радикалы в *in vitro* тестах DPPH и FRAP позволили предопределить его антиоксидантное действие при окислительном стрессе в условиях живого организма. Биологическая активность флавоноидов, фенольных кислот и полифенольных метаболитов, обнаруженных в составе фитопрепарата послужила основанием для эффективного купирования поражения печени на фоне токсического воздействия CCl_4 [213].

Установлено, что хлорогеновая кислота способна ингибировать интенсивность окислительного стресса, а обнаруженные в составе фитопрепарата лютеолин-7-О-глюкозид, кверцетин-3-О-галактозид (гиперозид) и мирицетин способны потенциировать его антиоксидантное действие [214]. В частности, гиперозид можеть ингибировать перекисное окисление липидов (ПОЛ) клеточных мембран и снижать внутриклеточную генерацию активных форм кислорода (АФК), тем самым предотвращать пероксид-индуцированный апоптоз гепатоцитов [215]. Дополнительно гиперозид способен ингибировать неконтролируемую аутофагию, индуцированную цитокиновым стрессом (ФНО-α, ИЛ-1β, ИЛ-6) [216]. В свою очередь, лютеолин-7-О-глюкозид может обуславливать комплексное антиоксидантное и противовоспалительное действие за счет инактивации сигнального пути JAK-STAT, являющегося каскадом передачи сигналов для большинства провоспалительных цитокинов [217].

Противовоспалительный потенциал выявленных БАС также может быть также опосредован супрессией сигнальных путей митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) и универсального транскрипционного фактора NF-κB, что приводит к подавлению провоспалительных сигнальных путей, в частности путем блокировки ключевых провоспалительных медиаторов, включая ФНО-α,

ИЛ-1β и ИЛ-6, а также супрессией активности циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) и каспазного пути апоптоза [218].

Другой немаловажный флавоноид, обнаруженный в составе фитопрепарата – мирицетин – способен подавлять избыточную выработку провоспалительных цитокинов посредством ингибирования фосфорилирования сигнального белка STAT1, играющего ключевую роль в запуске каскадных реакций воспалительного процесса [219]. Кроме того, мирицетин выступает индуктором сигнального пути Nrf2 – главного транскрипционного фактора контроля экспрессии генов эндогенного антиоксидантного комплекса, включая супероксиддисмутазу (СОД), каталазу (КАТ), глутатионпероксидазу (ГП) и параоксоназы [220]. Данный механизм может обосновать способность мирицетина снижать активность печеночных трансаминаз (АЛТ, АСТ) и тем самым предотвращать апоптоз гепатоцитов [221]. Обнаруженный в составе фитопрепарата фенольный метаболит акацетин-7-О-глюкозид также может обуславливать антиоксидантное и противовоспалительное действия, в основе которых лежит ингибирование таких прооксидантных ферментных систем, как моноаминоксидаза, ксантиноксидаза и циклооксигеназа [222]. В ранее проведенных исследованиях было установлено, что противовоспалительная активность другого вторичного метаболита, выявленного в составе исследуемого фитопрепарата – гидрокси-3-метоксибензальдегида (ванилина) – обусловлена ингибированием экспрессии генов, стимулирующих синтез медиаторов воспалительного процесса: ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО-α [223]. На модели CCl_4-гепатотоксичности на крысах была продемонстрирована гепатопротекторная активность ванилина, заключающаяся в снижении уровня печеночных трансаминаз и восстановлени белковосинтетической функции печени у экспериментальных животных [224].

На основании результатов экспериментальных исследований была составлена обобщающая схема, отражающая основные патологические изменения в печени при использованных моделях и векторы биологической активности фитопрепарата из корня *Arctium tomentosum* Mill. (Рисунок 24). Данная схема носит иллюстративный характер и предназначена для визуального обобщения полученных экспериментальных данных: морфологические изменения подтверждены соответствующими гистологическими исследованиями, приведенными в разделе результатов.

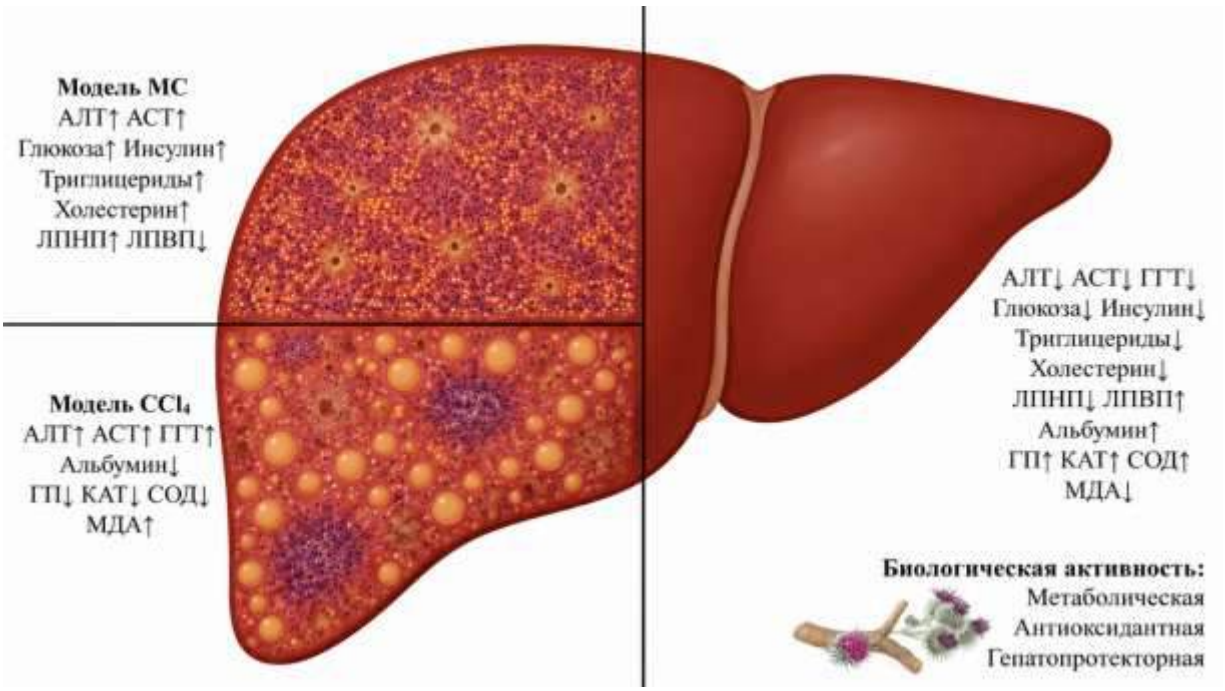


Рисунок 22 – Обобщающая схема основных морфофункциональных нарушений в печени при экспериментальных моделях метаболического синдрома и CCl_4-гепатотоксичности, и их коррекция на фоне введения фитопрепарата, полученного методом CO_2-экстракции из корня *Arctium tomentosum* Mill.

Из Рисунка 22 следует, что при развитии метаболического синдрома у экспериментальных мышей повышается уровень печеночных трансаминаз (АЛТ, АСТ), уровень глюкозы, инсулина, ТГ, холестерина, ЛПНП и снижается содержание ЛПВП в сыворотке крови, то есть происходит нарушение углеводного и липидного обменов. Введение фитопрепарата из корня *Arctium tomentosum* Mill. приводит к дозазависимой нормализации ферментативной активности печени, снижению гипергликемии, гиперинсулинемии и индекса инсулинорезистентности, а также к снижению жировой инфильтрации клеток печени и последующих клеточной инфильтрации и некробиоза гепатоцитов, что подтверждает метаболический механизм гепатопротекторного эффекта фитопрепарата.

При развитии CCl_4-гепатотоксичности у экспериментальных мышей наблюдается увеличение содержания ферментов цитолиза (АЛТ, АСТ) и холестаза (ГГТ), снижение фракции альбумина в общем белке, истощение ферментов антиоксидантной защиты (ГП, КАТ, СОД) и накопление вторичных продуктов перекисного окисления (МДА) в результате окислительного стресса. Применение фитопрепарата при CCl_4-гепатотоксичности у мышей приводило к нормализации уровня маркерных ферментов печени, восстановление белоксинтетической функции печени, восстановлению активности ферментов антиоксидантной защиты, снижению интенсивности перекисного окисления липидов, предотвращению цитолиза и сокращению зоны воспалительно-

некротических изменений, что подтверждает антиоксидатный механизм гепатопротекторного эффекта фитопрепарата.

Таким образом исследуемый фитопрепарат можно рассматривать как перспективное средство с метаболической, антиоксидантной, гепатопротекторной биологической активностями. Наиболее выраженное положительное действие фитопрепарат оказывал в дозах 200 и 400 мг/кг, при этом максимальная эффективность наблюдалась при дозе 400 мг/кг. Полученные результаты обосновывают целесообразность дальнейших фармакологических и клинических исследований данного фитопрепарата, с приоритетной оценкой дозы 400 мг/кг как наиболее эффективной и потенциально терапевтически значимой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа посвящена изучению биологической активности фитопрепарата из корня *Arctium tomentosum* Mill. полученного путем CO_2-экстракции. В результате проведенных исследований были изучены общее содержание флавоноидов и фенольных соединений в составе фитопрепарата, его полифенольный профиль и антиоксидантный потенциал в тестах DPPH и FRAP; цитотоксическое влияние на культуре мононуклеарных клеток; антимикробная активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий и дрожеподобных грибов; безопасность в остром и подостром экспериментах, эффективность на модели метаболического синдрома и на модели CCl_4-гепатотоксичности у мышей.

На основании полученных результатов сделаны следующие выводы:

1. Фитопрепарат из корня *Arctium tomentosum* Mill., полученный методом CO_2-экстракции содержит флавоноиды и фенольные соединения: среди которых преобладают акацетин-7-О-глюкозид (56.80 мкг/мл) и хлорогеновая кислота (17.20 мкг/мл). В минорных количествах идентифицированы 4-гидрокси-3-метоксибензальдегид (0.43 мкг/мл), гиперозид (0.36 мкг/мл), мирицетин (0.23 мкг/мл) и лютеолин-7-О-глюкозид (0.21 мкг/мл). Общее содержание флавоноидов составило 6.51 мг ЭР/мл, фенольных соединений – 0.96 мг ЭКК/мл. В *in vitro* тестах фитопрепарат проявил антирадикальную активность (DPPH (IC_{50}) = 35.00 мкг/мл) и восстановительную способность (FRAP = 5.72 мкмоль ЭТ/мл).

2. В результате расчета IC_{50} = 0.09 мг/мл в МТТ-тесте была определена концентрация фитопрепарата, соответствующая 50%-ному снижению жизнеспособности клеток. При концентрациях 0.001-0.010 мг/мл жизнеспособность клеток сохранялась на уровне 94.96-99.76% и статистически значимо не отличалась от контроля ($p > 0.05$), что позволило охарактеризовать данный диапазон как цитосовместимый.

3. Путем оценки антимикробной активности фитопрепарата были обнаружены его бактерицидное влияние в отношении *Staphylococcus aureus* для которого МИК составила 2.60 мг/мл и фунгицидное действие на *Candida albicans,* в отношении которого МИК составила 1.30 мг/мл.

4. В остром эксперименте был установлен VI класс токсичности фитопрепарата ($LD_{50} > 5000$ мг/кг), что соответствует категории нетоксичных веществ. В подостром эксперименте у мышей был обнаружен естественный прирост массы тела, не наблюдалось клинических признаков токсического действия и гибели животных, а также не было выявлено статистически значимых отклонений органометрических, гематологических и биохимических показателей. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии выраженного токсического действия фитопрепарата при многократном применении в исследованных дозах до 400 мг/кг.

5. На модели метаболического синдрома введение фитопрепарата в дозе 400 мг/кг обеспечивало сохранение функциональной активности гепатоцитов,

коррекцию углеводного и липидного обменов ($p < 0.001$), а также предотвращение структурного повреждения печени, подтверждённое морфологическими исследованиями, что свидетельствует об инсулинсенсибилизирующем и липидкорригирующем метаболическом действии фитопрепарата.

6. Применение фитопрепарата в дозе 400 мг/кг при CCl_4-гепатотоксичности у мышей обеспечивало нормализацию ферментативной и белоксинтетической функции печени, снижение интенсивности перекисного окисления липидов ($p < 0.001$), а также предотвращение жировой инфильтрации и некротических изменений, подтверждённое морфологическими и морфометрическими исследованиями, что свидетельствует об антиоксидантной и гепатопротекторной активности фитопрепарата.

7. На основании вышеизложенных экспериментальных данных можно заключить, что исследуемый фитопрепарат из корня *Arctium tomentosum* Mill. обладает антимикробной, метаболической, антиоксидантной и гепатопротекторной биологической активностями и может быть рекомендован для дальнейшего фармакологического и клинического исследований с приоритетной оценкой дозы 400 мг/кг как наиболее эффективной и потенциально терапевтически значимой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Newman D. J., Cragg G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019 // J. Nat. Prod. – 2020. – Vol. 83, № 3. – P. 770-803.
2. Atanasov A. G., Zotchev S. B., Dirsch V. M. et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities // Nat. Rev. Drug Discov. – 2021. – Vol. 20, № 3. – P. 200-216.
3. Lee Y. J., Choi J. S., Cho J. Y. et al. Arctium lappa ameliorates atopic dermatitis-like skin lesions in mice // J. Ethnopharmacol. – 2013. – Vol. 148, № 1. – P. 116-124.
4. Sohn S. H., Jang M. G., Kim W. W. et al. Anti-allergic effect of Arctium lappa L. in mice // J. Med. Food. – 2011. – Vol. 14, № 4. – P. 400-406.
5. Lee D. H., Kim J. S., Park Y. S. et al. Gastroprotective activity of Arctium lappa L. (Asteraceae) // J. Ethnopharmacol. – 2013. – Vol. 145, № 3. – P. 719-725.
6. Wang H., Xu J., Han T. et al. Effects of Burdock (Arctium lappa L.) oligosaccharides on gut microbiota and metabolism // Food Funct. – 2019. – Vol. 10, № 1. – P. 235-245.
7. Predes F. S., Diamante M. A. S., Dolder H. et al. Hepatoprotective effect of Arctium lappa L. root extract on liver toxicity induced by cadmium // Biol. Trace Elem. Res. – 2014. – Vol. 159. – P. 320-328.
8. Li D., Zhang L., Zhong J. et al. Arctigenin protects against liver injury from acute hepatitis by suppressing immune cells in mice // Int. Immunopharmacol. – 2018. – Vol. 58. – P. 31-38.
9. Gao Q., Yang Y., Wang Z. et al. Arctium lappa L. (Burdock): A Review of Its Phytochemistry and Pharmacology // Phytother. Res. – 2018. – Vol. 32, № 6. – P. 1210-1226.
10. Wu Y. C., Kuo S. C., Huang S. Y. et al. Arctium lappa extract inhibits fatty liver disease in high-fat diet-fed mice // J. Food Drug Anal. – 2017. – Vol. 25, № 2. – P. 352-361.
11. Magaña A. A., Kamdar N., Kim M. J. et al. Burdock (Arctium lappa L.) – A review of its benefits and use in food and health // J. Funct. Foods. – 2021. – Vol. 78. – Art. 104357.
12. Wang D., Ho B. S., Kim S. S. et al. Chlorogenic acid and its role in liver protection: A review // Curr. Pharm. Des. – 2019. – Vol. 25, № 30. – P. 3192-3201.
13. Zhang N., Zhou L., Yao S. et al. Lignans from the root of Arctium lappa and their anti-inflammatory activities // Nat. Prod. Res. – 2021. – Vol. 35, № 22. – P. 4721-4725.
14. Gao Q., Yang Y., Wang Z. et al. Arctium lappa L. (Burdock): A Review of Its Phytochemistry and Pharmacology // Phytother. Res. – 2018. – Vol. 32, № 6. – P. 1210-1226.

15. Strawa J. W., Jakimiuk K., Sahin S. et al. Phytochemical comparison of different Arctium species using HPLC-DAD-MS // Molecules. – 2020. – Vol. 25, № 21. – P. 5052.
16. Asrani S. K., Devarbhavi H., Eaton J. et al. Burden of liver diseases in the world // J. Hepatol. – 2019. – Vol. 70, № 1. – P. 151-171.
17. Heckley G., Jarl J., Gerdtham U. G. et al. The cost of illness of liver disease: A systematic review // Pharmacoeconomics. – 2018. – Vol. 36. – P. 1-17.
18. Riazi K., Azhari H., Charette J. H. et al. The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: a systematic review and meta-analysis // Lancet Gastroenterol. Hepatol. – 2022. – Vol. 7, № 9. – P. 851-861.
19. Friedman S. L., Neuschwander-Tetri B. A., Rinella M. et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies // Nat. Med. – 2018. – Vol. 24. – P. 908-922.
20. Targher G., Byrne C. D., Tilg H. NAFLD and increased risk of cardiovascular disease: mechanisms and management // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. – 2020. – Vol. 17. – P. 552-568.
21. Powell E. E., Wong V. W., Rinella M. E. Non-alcoholic fatty liver disease // Lancet. – 2021. – Vol. 397. – P. 2212-2224.
22. Zheng Y., Ley S. H., Hu F. B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications // Nat. Rev. Endocrinol. – 2018. – Vol. 14. – P. 88-98.
23. Schwabe R. F., Tabas I., Pajvani U. B. Mechanisms of Fibrosis Development in NASH // Gastroenterology. – 2020. – Vol. 158, № 7. – P. 1913-1928.
24. Gillessen A., Schmidt H. H. Silymarin as Supportive Treatment in Liver Diseases: A Narrative Review // Adv. Ther. – 2020. – Vol. 37, № 4. – P. 1279-1301.
25. Panahi Y., Kianpour P. et al. Efficacy of artichoke leaf extract in non-alcoholic fatty liver disease: A pilot double-blind placebo-controlled trial // Phytother. Res. – 2018. – Vol. 32, № 7. – P. 1382-1387.
26. Li X, Sun R, Liu R. Natural products in licorice for the therapy of liver diseases: Progress and future opportunities // Pharmacol Res. – 2019 – 144. – P. 210-226.
27. Mansour-Ghanaei F., Pourmasoumi M. et al. Efficacy of curcumin/turmeric on liver enzymes in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review of randomized controlled trials // Integr. Med. Res. – 2019. – Vol. 8, № 2. – P. 57-61.
28. Speroni E., Cervellati R., Govoni P. et al. Efficacy of different Cynara scolymus preparations on liver complaints // J. Ethnopharmacol. – 2003. – Vol. 86, № 2-3. – P. 203-211.
29. Wang J., Ghosh S. S., Ghosh S. Curcumin-induced bile acid secretion and its role in liver protection // J. Lipid Res. – 2014. – Vol. 55, № 2. – P. 232-234.
30. Je DD, Tan YM, Fuller G, Nigam P. Licorice-Induced Pseudohyperaldosteronism: A Case Report // Clin Case Rep. – 2025. – 12. – 13(1). – e70005.

31. Адекенов С. М. Состояние и перспективы развития производства фитопрепаратов в Казахстане // Химико-фармацевтический журнал. – 2013. – Т. 47, № 5. – С. 28-33.
32. Ивасенко С. А., Ануарбекова С. С., Ишмуратова М. Ю. и др. Фитохимическое исследование видов рода Arctium, произрастающих в Центральном Казахстане // Фармация и фармакология. – 2015. – № 4 (11). – С. 16-20.
33. Тлеубергенова Н. Ж., Адекенов С. М., Итжанова Х. И. Разработка и стандартизация новых гепатопротекторных лекарственных средств на основе растительного сырья // Фармация Казахстана. – 2018. – № 4. – С. 22-27.
34. Wang D., Long X., He X. et al. Supercritical fluid extraction of Arctium lappa L. roots: Optimization and antioxidant activity // Sep. Sci. Technol. – 2016. – Vol. 51, № 11. – P. 1891-1901.
35. Bernardo M. A., Silva M. L., Santos E. et al. Bioactive Compounds and Health Benefits of Arctium lappa L. // Molecules. – 2021. – Vol. 26, № 14. – Art. 4215.
36. Boulfia M., Lamkanfi M. et al. The Roadmap of Arctium lappa Bioactive Compounds: From Life Cycle to Potential Biomedical Applications // Plants. – 2023. – Vol. 12, № 21. – Art. 3680.
37. Abubakar A. R., Haque M. Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for early biomedical research // MethodsX. – 2020. – Vol. 7. – Art. 101021.
38. ГОСТ 8050-85. Двуокись углерода газообразная и жидкая. Технические условия.
39. Zhang Q. W., Lin L. G., Ye W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review // Chin. Med. – 2018. – Vol. 13. – Art. 20.
40. Azwanida N. N. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation // Med. Aromat. Plants. – 2015. – Vol. 4, № 3. – P. 196.
41. Chemat F., Vian M. A. et al. Green extraction of natural products: Origins, current status, and future challenges // TrAC Trends Anal. Chem. – 2019. – Vol. 118. – P. 248-263.
42. Morales F., Padilla S., Falconí F. Medicinal Plants Used in Traditional Herbal Medicine in the Province of Chimborazo, Ecuador // Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med. – 2016. – Vol. 14, № 1. – P. 10-15.
43. Proestos C. The Benefits of Plant Extracts for Human Health // Foods. – 2020. – Vol. 9, № 11. – Art. 1653.
44. Langi P., Kiokias S., Varzakas T. et al. Carotenoids: From Plants to Food and Feed Industries // Microbial Carotenoids, Methods and Protocols. – 2018. – Vol. 1852. – P. 57-71.

45. Kiokias S., Proestos C., Oreopoulou V. Phenolic Acids of Plant Origin—A Review on Their Antioxidant Activity In Vitro // Foods. – 2020. – Vol. 9, № 4. – Art. 534.
46. Marrelli M. Medicinal Plants // Plants (Basel). – 2021. – Vol. 10, № 7. – Art. 1355.
47. Newman D. J., Cragg G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019 // J. Nat. Prod. – 2020. – Vol. 83, № 3. – P. 770-803.
48. Turrini F., Donno D., Beccaro G. L. et al. Bud-Derivatives, a Novel Source of Polyphenols and How Different Extraction Processes Affect Their Composition // Foods. – 2020. – Vol. 9, № 10. – Art. 1343.
49. ICH Q8-Q11 Pharmaceutical Development // International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. – 2009. – 28 p.
50. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: [updated editions 2021–2024]. – Paris: OECD Publishing, 2024. – URL: oecd-ilibrary.org (дата обращения: 02.05.2024).
51. Об утверждении Правил проведения доклинических (неклинических) исследований безопасности и качества лекарственных средств // Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан. – Астана, 2021.
52. EMA/HMPC/294188/2013. Assessment report on Silybum marianum (L.) Gaertn., fructus. Final // European Medicines Agency. – Amsterdam, 2018. – 78 p.
53. EMA/HMPC/321097/2012. Assessment report on Ginkgo biloba L., folium // European Medicines Agency. – Amsterdam, 2014. – 83 p.
54. EMA/HMPC/424584/2016. Assessment report on Echinacea purpurea (L.) Moench, radix // European Medicines Agency. – Amsterdam, 2017. – 45 p.
55. EMA/HMPC/101304/2008. Assessment report on Hypericum perforatum L., herba (well-established medicinal use) // European Medicines Agency. – Amsterdam, 2009. – 56 p.
56. EMA/HMPC/2832/2007. Assessment report on Valeriana officinalis L., radix // European Medicines Agency. – Amsterdam, 2017. – 42 p.
57. EMA/HMPC/158728/2012. Assessment report on Panax ginseng C.A. Meyer, radix // European Medicines Agency. – Amsterdam, 2014. – 54 p.
58. EMA/HMPC/232400/2011. Assessment report on Aesculus hippocastanum L., semen // European Medicines Agency. – Amsterdam, 2012. – 48 p.
59. Dudek-Makuch M., Studzińska-Sroka E. Horse chestnut – efficacy and safety in chronic venous insufficiency: an overview // Rev. Bras. Farmacogn. – 2015. – Vol. 25, № 5. – P. 533–541.
60. Gallelli L. Escin: a review of its anti-edematous, anti-inflammatory, and venotonic properties // Drug Des. Devel. Ther. – 2019. – Vol. 13. – P. 3425–3437.
61. Mastron K. et al. Silymarin, a promising pharmacological agent for liver diseases // Free Radic. Biol. Med. – 2015. – Vol. 82. – P. 1–17.

62. Singh S. K. et al. Neuroprotective and Cognitive-Enhancement Effects of Ginkgo biloba // Neurochem. Res. – 2019. – Vol. 44, № 10. – P. 2351–2362.
63. Aarland R. C. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of Echinacea purpurea extracts // Food Chem. – 2017. – Vol. 232. – P. 544–551.
64. Zirak N. et al. A review on Hypericum perforatum L. in the treatment of neuropsychiatric disorders // Phytother. Res. – 2019. – Vol. 33. – P. 1914–1922.
65. Becker A. et al. The anxiolytic effects of a Valerian extract is based on the valerenic acid content // BMC Complement. Altern. Med. – 2014. – Vol. 14. – P. 267.
66. Shinjyo N. et al. Valerian Root in Treating Sleep Problems and Associated Disorders // J. Evid. Based Integr. Med. – 2020. – Vol. 25. – Art. 2515690X20967323.
67. Teschke R. Hepatotoxicity: Alimentary Supplements, Herbal Medicines, and Traditional Chinese Medicines // Int. J. Mol. Sci. – 2023. – Vol. 24, № 11. – Art. 9435.
68. Federico A., Dall'Aglio A. F., Loguercio C. Silymarin/Silybin and Chronic Liver Disease: A Marriage of Many Years // Molecules. – 2017. – Vol. 22, № 2. – Art. 191.
69. Azzini E. et al. Phytochemicals in the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: The Roles of Polyphenols // Curr. Pharm. Des. – 2020. – Vol. 26, № 14. – P. 1551–1558.
70. Ezhilarasan D. Hepatotoxic agents and the role of silymarin: A review // Biol. Trace Elem. Res. – 2021. – Vol. 199. – P. 182–193.
71. Trefts E., Gannon M., Wasserman D. H. The Liver: A Keystone in Integrative Physiology// Physiology. – 2017. – Vol. 32, № 3. – P. 174–185.
72. Kalra A., Yetiskul E., Wehrle C. J. et al. Physiology, Liver// StatPearls [Internet]. – 2023. – URL: ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535438/ (дата обращения: 03.05.2026).
73. Zhu Z., Zhang X., Pan Q., Zhang L., Chai J. In-depth analysis of de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease: Mechanism and pharmacological interventions // Liver Res. – 2023. – 19. – 7(4). – P. 285-295.
74. Linden A.G., Li S., Choi H.Y., Fang F., Fukasawa M., Uyeda K., Hammer R.E., Horton J.D., Engelking L.J., Liang G. Interplay between ChREBP and SREBP-1c coordinates postprandial glycolysis and lipogenesis in livers of mice // J Lipid Res. – 2018. – 59(3). – P. 475-487.
75. Bravo-Ruiz I., Medina M.Á., Martínez-Poveda B. From Food to Genes: Transcriptional Regulation of Metabolism by Lipids and Carbohydrates // Nutrients. – 2021. – 30. – 13(5). – 1513.
76. Gao B. et al. Liver: Unitary Organ or a Collection of Functional Units? // Cell Biosci. – 2024. – Vol. 14. – Art. 12.
77. Ben-Moshe S., Itzkovitz S. Spatial heterogeneity in the mammalian liver // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. – 2019. – Vol. 16, № 7. – P. 395-410.

78. Lu Y., Cederbaum A. I. CYP2E1 and oxidative liver injury of specialized cells // Vitam. Horm. – 2018. – Vol. 107. – P. 229–254.
79. Trefts E., Gannon M., Wasserman D. H. The liver // Curr. Biol. – 2017. – Vol. 27, № 21. – P. R1147-R1151.
80. Cederbaum A. I. Molecular mechanisms of the microsomal mixed function oxidase system and its role in alcoholic liver injury // Front. Biosci. (Landmark Ed). – 2021. – Vol. 26, № 1. – P. 1–28.
81. Ramachandran A., Jaeschke H. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in drug-induced liver injury // J. Clin. Transl. Res. – 2018. – Vol. 4, № 1. – P. 1–18.
82. Kosmalski M., Śliwińska A., Drzewoski J. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease or Type 2 Diabetes Mellitus—The Chicken or the Egg Dilemma // Biomedicines. – 2023. – Vol. 11, № 4. – Art. 1097.
83. Polyzos S. A., Kountouras J., Mantzoros C. S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics // Metabolism. – 2019. – Vol. 92. – P. 82-97.
84. Atanasov A. G. et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities // Nat. Rev. Drug Discov. – 2021. – Vol. 20. – P. 200–216.
85. World Health Organization (WHO). Global report on traditional and complementary medicine // Geneva, 2024.
86. Newman D. J., Cragg G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019 // J. Nat. Prod. – 2020. – Vol. 83, № 3. – P. 770-803.
87. Amin A, Park S. Chemotaxonomy, an Efficient Tool for Medicinal Plant Identification: Current Trends and Limitations // Plants (Basel). – 2025. – 19. – 14(14) – 2234.
88. Singh, D.P.; Bisen, M.S.; Shukla, R.; Prabha, R.; Maurya, S.; Reddy, Y.S.; Singh, P.M.; Rai, N.; Chaubey, T.; Chaturvedi, K.K.; et al. Metabolomics-Driven Mining of Metabolite Resources: Applications and Prospects for Improving Vegetable Crops. // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – 23. – 12062.
89. Smith J. A. et al. Polyphenolic compounds of Asteraceae family as immune modulators // Phytochem. Rev. – 2024. – Vol. 23, № 1. – P. 45-67.
90. Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R. Flavonoids: an overview // J. Nutr. Sci. – 2016. – Vol. 5. – Art. e47.
91. Rolnik A., Olas B. The Plants of the Asteraceae Family as Agents in the Protection of Human Health // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – Vol. 22, № 6. – Art. 3009.
92. Shyam M., Sabina E. P. Harnessing the power of Arctium lappa root: a review of its pharmacological properties and therapeutic applications// Nat. Prod. Bioprospect. – 2024. – Vol. 14. – Art. 49.
93. Yosri N., Alsharif S. M., Xiao J. et al. Arctium lappa (Burdock): Insights from ethnopharmacology potential, chemical constituents, clinical studies, pharmacological utility and nanomedicine // Biomed. Pharmacother. – 2023. – Vol. 158. – Art. 114104.

94. Chen X., Liu Y. Arctigenin: A review of its antibacterial mechanisms and clinical potential // Front. Pharmacol. – 2023. – Vol. 14. – P. 985-1002.
95. Boussahel S. Comparative Study of the Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Arctium lappa L. and Arctium tomentosum Mill. Leaves // Nat. Prod. Res. – 2020. – Vol. 34, № 11. – P. 1579–1583.
96. Yang Y., Zhang Z., Li S. Synergy effects of plant polyphenols and their mechanisms // Food Chem. – 2022. – Vol. 372. – Art. 131236.
97. Predes F. S., Ruiz M. A., Rocha J. C. et al. Antioxidative and protective effects of Arctium lappa on liver injury // Phytother. Res. – 2011. – Vol. 25, № 6. – P. 896–900.
98. Vukovic N., Sukdolak S., Solujic S. Chemical composition of the essential oil and the antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activities of the Arctium tomentosum Mill. extract // Rec. Nat. Prod. – 2014. – Vol. 8, № 3. – P. 255–267.
99. Zhang Q., Lin L., Ye W. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review // Chin. Med. – 2021. – Vol. 16. – Art. 6.
100. Azwanida N. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation // Med. Aromat. Plants. – 2021. – Vol. 10. – P. 100–106.
101. Dai J., Mumper R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties // Molecules. – 2022. – Vol. 27. – Art. 1234.
102. Chemat F., Vian M. A., Cravotto G. Green Extraction of Natural Products: Origins, Current Status, and Future Challenges // Int. J. Mol. Sci. – 2012. – Vol. 13, № 3. – P. 3171-3211.
103. Wang L., Weller C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants using ultrasound // Ultrason. Sonochem. – 2022. – Vol. 82. – Art. 105905.
104. Aktı N., Yildiz S. Exploring ultrasound-induced free radical formation: A comparative study in water and sour cherry juice using glutathione and terephthalic acid indicators // Ultrason Sonochem. – 2025. – 112. – 107193.
105. Mustafa A., Turner C. Microwave-assisted extraction of bioactive compounds: from laboratory to industrial scale // TrAC Trends Anal. Chem. – 2023. – Vol. 158. – Art. 116876.
106. Nadar S. S., Rathod V. K. Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from plant materials // Green Chem. – 2021. – Vol. 23. – P. 8892–8910.
107. Zghaibi M., Shehadeh M., Abu-Orabi S. et al. Different methods of extraction of bioactive compounds and their effect on biological activity: A review // J. Pharm. Res. Int. – 2023. – Vol. 35, № 28. – P. 1-15.
108. Yadav A., Sharma S., Gupta S. et al. Conventional extraction methods versus novel extraction methods of bioactive compounds from some medicinal plants // Int. J. Green Pharm. – 2022. – Vol. 16, № 3. – P. 1-12.

109. Reverchon E., De Marco I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter // J. Supercrit. Fluids. – 2022. – Vol. 181. – Art. 105463.
110. Da Porto C., Natolino A. et al. Supercritical CO_2 extraction of bioactive compounds from plant matrices: optimization and applications // Food Chem. – 2023. – Vol. 405. – Art. 134784.
111. Nahar L., Sarker S. D. Supercritical fluid extraction in natural product research: recent advances and applications // Phytochem. Anal. – 2024. – Vol. 35, № 2. – P. 145–162.
112. Pourmortazavi S. M., Hajimirsadeghi S. S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis // J. Chromatogr. A. – 2021. – Vol. 1657. – Art. 462579.
113. Rein M. J., Renouf M. et al. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy // Br. J. Clin. Pharmacol. – 2022. – Vol. 88, № 2. – P. 472–484.
114. Uwineza P. A., Gramza-Michałowska A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds from plant materials – A review // Molecules. – 2020. – Vol. 25, № 17. – Art. 3863.
115. Puri M., Sharma D., Tiwari A. K. Downstream processing of supercritical fluid extracts // Methods Mol. Biol. – 2012. – Vol. 824. – P. 515-528.
116. Wang D., Long X., He X. et al. Supercritical fluid extraction of Arctium lappa L. roots: Optimization and antioxidant activity // Sep. Sci. Technol. – 2016. – Vol. 51, № 11. – P. 1891-1901.
117. Mustafa A., Turner C. Overcoming the solubility limitations of polar compounds in supercritical carbon dioxide // Reviews in Analytical Chemistry. – 2011. – Vol. 30, № 3-4. – P. 113-144.
118. Saeed M., Naveed M., Arif M. et al. Green extraction approaches for polyphenols and their application in pharmaceutical sciences // Arab. J. Chem. – 2023. – Vol. 16, № 4. – Art. 104622.
119. Li B., Xu Y., Jin Y. et al. Systems pharmacology and network-based approaches for herbal medicine research // Front. Pharmacol. – 2021. – Vol. 12. – Art. 682103.
120. Williamson E. M. Synergy and other interactions in phytomedicines // Phytomedicine. – 2001. – Vol. 8, № 5. – P. 401–409.
121. Zhou X., Seto S. W., Chang D. et al. Synergistic effects of Chinese herbal medicine: a systems biology perspective // Evid. Based Complement. Alternat. Med. – 2014. – Vol. 2014. – Art. 451036.
122. Alara O. R., Abdurahman N. H., Ukaegbu C. I. Review on polyphenols' extraction from plant materials: Techniques, optimization and analysis // Mater. Sci. Energy Technol. – 2021. – Vol. 4. – P. 173–187.
123. Etaware P. M., America J., Egara O. W., Ekun V. S. Herbal Medicine: Scientific Validation and Future Prospects // Journal of Preclinical and Phytochemical Research. – 2025. – Vol. 12, No. 4. – P. 45–58.

124. Tannenbaum J., Bennett B. T. Russell and Burch's 3Rs strategy for the optical animal research: history and current application // J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. – 2015. – Vol. 54, № 2. – P. 120-132.
125. Siddiqui S. A., et al. How to assess antioxidant activity? Advances, limitations, and future perspectives // Phytochem. Anal. – 2025. – Vol. 36, № 2. – P. 112–128.
126. Gülçin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated review // Arch. Toxicol. – 2020. – Vol. 94, № 3. – P. 651–715.
127. Iserhienrhien L., Paulinus O., Etaware P. M. Antimicrobial Effect of Geophila obvallata (Schumach) Didr. Leaf Extracts Against Some Medically Important Bacteria and Fungi // Archives of Ecotoxicology. – 2021. – Vol. 3, No. 4. – P. 103–109.
128. Alexopoulou A., Agiasotelli D., Vasilieva L. E., Dourakis S. P. Bacterial translocation markers in liver cirrhosis // Ann. Gastroenterol. – 2017. – Vol. 30, No. 5. – P. 486–497.
129. Asuzu P. C., Trompeter N. S., Cooper C. R., Besong S. A., Aryee A. N. A. Cell Culture-Based Assessment of Toxicity and Therapeutics of Phytochemical Antioxidants // Molecules. – 2022. – Vol. 27, No. 3. – P. 1087.
130. Романова, М. А. Изучение цитотоксичности биологически активных соединений на культуре клеток / М. А. Романова, А. Ш. Додонова. — Текст : непосредственный // Молодой ученый. — 2016. — № 18 (122). — С. 110-114.
131. Миронов А. Н., Бунятян Н. Д., Васильев А. Н., Верстакова О. Л. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая // М.: Гриф и К. – 2012. – Vol. 1. – P. 1–944.
132. Wong S. K., Chin K. Y., Suhaimi F. H. et al. Animal models of metabolic syndrome: a review // Nutr. Metab. (Lond). – 2016. – Vol. 13. – Art. 65.
133. Farghali H., Kemelo M. K., Wojnarova L., Canova N. In Vitro and In Vivo Experimental Hepatotoxic Models in Liver Research: Applications to the Assessment of Potential Hepatoprotective Drugs // Physiol. Res. – 2016. – Vol. 65, No. 4. – P. 419–431.
134. WFO. The World Flora Online. Available online: https://worldfloraonline.org/taxon/wfo-4000002920 (accessed on 5 January 2024).
135. Флора Казахстана. Т. 9. / под ред. Н. В. Павлова. – Алма-Ата: Изд-во АН КазССР, 1966. – 640 с.
136. Nicolescu A., Bunea C. I., Mocan A. Total flavonoid content revised: An overview of past, present, and future determinations in phytochemical analysis // Anal. Biochem. – 2025. – Vol. 700. – Art. 115794.
137. Way M. L., Jones J. E., Nichols D. S. et al. A Comparison of Laboratory Analysis Methods for Total Phenolic Content of Cider // Beverages. – 2020. – Vol. 6, № 3. – Art. 55.

138. Baliyan S., Mukherjee R., Priyadarshini A., Vibhuti A., Gupta A., Pandey R..., Chang C.M. Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of Ficus religiosa // Molecules. – 2022. – 27(4). – 1326.
139. Benzie I.F.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay // Anal. Biochem. – 1996. – Vol. 239. – P. 70–76.
140. Mosmann T., Jafarnejad S., Taghikhani M., Hassan Z. M. Evaluating the Proliferation and Viability of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Using MTT Assay // Journal of Preclinical and Phytochemical Research. – 2017. – Vol. 12, No. 2. – P. 73–81.
141. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
142. Clinical and Laboratory Standards Institute. M27 - Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard. – 4th ed. – Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.
143. Bampidis V., Azimonti G., Bastos M.L., Christensen H., Dusemund B., Kos Durjava M., Kouba M., López-Alonso M., López Puente S., Marcon F. et al. Safety and efficacy of sodium carboxymethyl cellulose for all animal species. // EFSA J. – 2020. – 18(7):e06211.
144. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD/OCDE). Test. No. 420: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure; OECD Guidelines for the Testing of Chemicals; OECD: Paris, France, 2008; pp. 1–27.
145. Yaghoubi M., Mousavi Z., Rastegar T. et al. Safety Assessment of Arctium lappa L. Fruit Extract in Female Wistar Rats: Acute and Repeated Oral Toxicity Studies // Res. J. Pharmacogn. – 2019. – Vol. 6, № 2. – P. 39-48.
146. Saleem U., Amin S., Ahmad B. et al. Acute oral toxicity evaluation of aqueous ethanolic extract of Saccharum munja Roxb. roots in albino mice as per OECD 425 TG // Toxicol. Rep. – 2017. – Vol. 4. – P. 580-585.
147. Dantas F. G. D. S., Araújo R. P. et al. Cytotoxicity, mutagenicity and acute oral toxicity of aqueous Ocotea minarum leaf extracts // Nat. Prod. Res. – 2022. – Vol. 36, № 4. – P. 1138-1142.
148. Hafiz Mail M., Seeni A., Anis Shafie F. et al. Acute Oral Toxicity Assessment of Aqueous Extract of Streblus asper Root in Sprague Dawley Rats according to OECD 420 TG // J. Pioneering Med. Sci. – 2025. – Vol. 14, № 8. – P. 48-52.
149. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD/OCDE). Test. No. 407: Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents; OECD Guidelines for the Testing of Chemicals; OECD: Paris, France, 2018; pp. 1–16.

150. De Souza L., Barros W. M., De Souza R. M. et al. Impact of different fructose concentrations on metabolic and behavioral parameters of male and female mice// Physiol. Behav. – 2021. – Vol. 228. – Art. 113187.
151. Chen I.H., Cheng J.T., Tong Y.C. Metabolic Syndrome Induced Bladder Cannabinoid Receptor Changes in the Fructose-Fed Rats // LUTS Low. Urin. Tract Symptoms. – 2017. – Vol. 10. – P. 198–203.
152. Unsal V., Cicek M., Sabancilar İ. Toxicity of carbon tetrachloride, free radicals and role of antioxidants // Rev Environ Health. – 2020. – 36(2). – P. 279-295
153. D. Wang, L. Zhou, Y. Wang Phytochemistry, pharmacology and clinical trials of Arctium lappa L.: A review // Journal of Ethnopharmacology. – 2024. – Vol. 319. – Art. 117186.
154. N. Tajik, M. Tajik, I. Ochiai Antioxidant and anti-inflammatory properties of chlorogenic acid // European Journal of Pharmacology. – 2017. – Vol. 811. – P. 143–154.
155. S. Singh, P. Sharma, K. Singh Acacetin: A review of its cancer chemopreventive, anti-inflammatory, and neuroprotective potential // Phytomedicine. – 2020. – Vol. 77. – Art. 153284.
156. Yalçın S., Kasnak C., Palamutoğlu R. et al. Antioxidant Activity and Phytochemical Profile of Eight Wild Edible Plants Grown in Afyonkarahisar, Türkiye // Akad. Gıda. – 2025. – Vol. 23, № 1. – P. 12–19.
157. Sharma S., Padhi S., Kumari M., Patnaik S., Sahoo D. Antioxidant Potential of Selected Wild Edible Leafy Vegetables of Sikkim Himalayan Region: Effects of Cooking Methods and Gastrointestinal Digestion on Activity // Front. Nutr. – 2022. – Vol. 9. – P. 861347.
158. Cui J., Zong W., Zhao N. et al. Burdock (Arctium lappa L.) leaf flavonoids rich in morin and quercetin 3-O-rhamnoside ameliorate lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative stress in RAW264.7 cells // Food Sci. Nutr. – 2022. – Vol. 10, № 8. – P. 2718–2726.
159. Predes F. S., Ruiz A. L. T. G., Carvalho J. E. et al. Antioxidative and in vitro antiproliferative activity of Arctium lappa root extracts // BMC Complement. Altern. Med. – 2011. – Vol. 11. – Art. 25.
160. Chaves N., Santiago A., Alías J. C. Quantification of the antioxidant activity of plant extracts: analysis of sensitivity and hierarchization based on the method used // Antioxidants. – 2020. – Vol. 9, № 1. – P. 76.
161. Aitynova A. E., Ibragimova N. A., Shalakhmetova T. M. et al. Cytotoxic impact of extract from the root of Arctium tomentosum Mill. // Progress in Science: Proc. of Conf. (Brussels, Dec. 15-16, 2022). – Brussels, 2022. – DOI: 10.5281/zenodo.7455298.
162. Aitynova A., Ibragimova N., Shalakhmetova T., Vassilyeva K., Issayeva D. Cytotoxicity, acute, and sub-chronic toxicity of the Arctium tomentosum Mill. root extract. // J App Biol Biotech. 2024. – 12(3). – P. 67-73.

163. Ogbole O. O., Segun P. A., Adeniji A. J. In vitro cytotoxic activity of medicinal plants from Nigeria ethnomedicine on Rhabdomyosarcoma cancer cell line and HPLC analysis of active extracts // BMC Complement. Altern. Med. – 2017. – Vol. 17. – Art. 494.
164. Zhang H. W. et al. Flavonoids inhibit cell proliferation and induce apoptosis and autophagy through downregulation of PI3Kγ mediated PI3K/AKT/mTOR pathway in human breast cancer cells // Sci. Rep. – 2018. – Vol. 8. – Art. 11255.
165. Aitynova A. E., Ibragimova N. A., Shalakhmetova T. M. et al. Antimicrobial effect of extract from root of Arctium tomentosum Mill. (woolly burdock) against several reference strains// Int. J. Biol. Chem. – 2022. – Vol. 15, № 2. – P. 10-17.
166. Silva N. C. C., Fernandes Júnior A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity // J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis. – 2010. – Vol. 16, № 3. – P. 402–413.
167. Breijyeh Z., Jubeh B., Karaman R. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It // Molecules. – 2020. – Vol. 25, No. 6. – P. 1340.
168. Gizaw A., Marami L. M., Teshome I., Sarba E. J., Admasu P., Babele D. A., Dilba G. M., Bune W. M., Bayu M. D., Tadesse M., Abdisa K. Phytochemical Screening and In Vitro Antifungal Activity of Selected Medicinal Plants against Candida albicans and Aspergillus niger in West Shewa Zone, Ethiopia // Adv. Pharmacol. Pharm. Sci. – 2022. – Vol. 2022. – P. 3299146.
169. Calabrese E. J., Agathokleous E., Kapoor R., Kozumbo W. J. Hormesis and Vitagenes: A Strategy for Nourishing and Restoring Healthy Lifespan // Int. J. Mol. Sci. – 2024. – Vol. 25, No. 3. – P. 1381.
170. Hodge H. C., Sterner J. H. Tabulation of toxicity classes // Am. Ind. Hyg. Assoc. Q. – 1949. – Vol. 10, № 4. – P. 93–96.
171. Jackson Laboratory. Age-related body weight changes in C57BL/6J mice // J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. – 2013. – Vol. 52, № 2. – P. 174–182.
172. Liu Y., Wang Q., Zhao J. Sex-related differences in growth and hematology of laboratory mice // Comp. Med. – 2020. – Vol. 70. – P. 241–249.
173. Gad S. C. Animal Models in Toxicology // Boca Raton : CRC Press. – 2016. – 512 p.
174. Doeing D. C., Borowicz J. L., Crockett E. T. Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods // BMC Clin. Pathol. – 2003. – Vol. 3, № 1. – Art. 3.
175. Patel S., Patel S., Kotadiya A. et al. Comparative Analysis of the Effect of Sex and Age on the Hematological and Biochemical Profile of BALB/c and C57BL/6 Inbred Mice // J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. – 2025. – Vol. 64, № 1. – P. 132-145.

176. Alcicek F. C., Mohaissen T., Bulat K. et al. Sex-Specific Differences of Adenosine Triphosphate Levels in Red Blood Cells Isolated From ApoE/LDLR Double-Deficient Mice // Front. Physiol. – 2022. – Vol. 13. – Art. 839323.
177. Kim H., Park J., Lee S. Safety assessment of plant-derived compounds in rodents: Serum biochemistry study // Toxicol. Rep. – 2020. – Vol. 7. – P. 1023–1032.
178. Al-Dhabi N. A., Arasu M. V., Park C. H. Biochemical safety evaluation of medicinal plant extracts in mice // Food Chem. Toxicol. – 2019. – Vol. 128. – P. 53–60.
179. Aitynova A., Dyusebayeva M., Issayeva D., Berganayeva G., Ibragimova N., Berganayeva A., Shalakhmetova T., Sevastre B. CO_2-extract–based phytopreparation from *Arctium tomentosum* Mill. roots exhibits no acute and subacute toxicity and sup-presses xylene-induced ear edema and LPS-induced acute inflammation in mice // Molecules. – 31. – 1900.
180. Zhang X., Li W., Chen L. Subacute toxicity evaluation of a herbal extract in mice: Biochemical assessment // J. Ethnopharmacol. – 2021. – Vol. 267. – Art. 113529.
181. Green C. L., Christian H. C., Ohlig C. et al. Sex differences in hematology and clinical chemistry in the aging C57BL/6J mouse // Front. Physiol. – 2022. – Vol. 13. – Art. 936301.
182. Kim H., Park J., Lee S. Safety assessment of plant-derived compounds in rodents // Toxicol. Rep. – 2020. – Vol. 7. – P. 1023–1032.
183. Singh R., Kaur P., Saini R. Subacute oral toxicity of bioactive plant compounds // Regul. Toxicol. Pharmacol. – 2018. – Vol. 97. – P. 125–133.
184. Boehm, O. Clinical chemistry reference intervals for C57BL/6J, Clean and Healthy Mice // Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. – 2007. – Vol. 46, № 4. – P. 59–65.
185. Williamson G. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion // Mol. Nutr. Food Res. – 2013. – Vol. 57, № 1. – P. 48–57.
186. Tilg H., Moschen A. R. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease // Trends Endocrinol. Metab. – 2008. – Vol. 19, № 10. – P. 371–379.
187. Buzzetti E., Pinzani M., Tsochatzis E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease // Metabolism. – 2016. – Vol. 65, № 8. – P. 1038–1048.
188. Hanhineva K. et al. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism // Int. J. Mol. Sci. – 2010. – Vol. 11, № 4. – P. 1365–1402.
189. Tsalamandris S. et al. The role of inflammation in diabetes // Curr. Pharm. Des. – 2019. – Vol. 25, № 11. – P. 1160–1174.
190. Рыжковская Е. Л., Кузнецова Т. Е., Калиновская Е. И., Лузина Е. В. Морфологические изменения ткани печени крыс с моделированным метаболическим синдромом // Вестн. БГМУ. – 2017. – № 2. – С. 132–135.

191. Aitynova A., Ibragimova N., Shalakhmetova T., Nussirbekova A., Ponomareva G. Oral administration of Arctium tomentosum Mill. CO2-extract alleviates the diet induced metabolic disorder in mice // BIO Web Conf. – 2024. – 100. – 01003.
192. Lam T. P., Tran N. N., Pham L. D., Lai N. V., Dang B. N., Truong N. N., Nguyen-Vo S. K., Hoang T. L., Mai T. T., Tran T. D. Flavonoids as dual-target inhibitors against alpha-glucosidase and alpha-amylase: a systematic review of in vitro studies // Nat. Prod. Bioprospect. – 2024. – Vol. 14, No. 1. – P. 4.
193. Han X., Wang P., Zhang J., Lv Y., Zhao Z., Zhang F., Shang M., Liu G., Wang X., Cai S. et al. alpha-Glucosidase Inhibition Mechanism and Anti-Hyperglycemic Effects of Flavonoids from Astragali Radix and Their Mixture Effects // Pharmaceuticals. – 2025. – Vol. 18, No. 5. – P. 744.
194. Chen J., Li Y., Yu B., Chen D., Mao X., Zheng P., Luo J., He J. Dietary chlorogenic acid improves growth performance of weaned pigs through maintaining antioxidant capacity and intestinal digestion and absorption function // J. Anim. Sci. – 2018. – Vol. 96, No. 3. – P. 1108–1118.
195. Chen J., Liu B., Yao X. et al. AMPK/SIRT1/PGC-1alpha Signaling Pathway: Molecular Mechanisms and Targeted Strategies From Energy Homeostasis Regulation to Disease Therapy // CNS Neurosci. Ther. – 2025. – Vol. 31, No. 11. – P. e70657.
196. Taheri Y., Suleria H. A. R., Martins N., Sytar O., Beyatli A., Yeskaliyeva B., Seitimova G., Salehi B., Semwal P., Painuli S. et al. Myricetin bioactive effects: moving from preclinical evidence to potential clinical applications // BMC Complement. Med. Ther. – 2020. – Vol. 20, No. 1. – P. 241.
197. Esler W. P., Cohen D. E. Pharmacologic inhibition of lipogenesis for the treatment of NAFLD // J. Hepatol. – 2024. – Vol. 80, No. 2. – P. 362–377.
198. O'Farrell M., Duke G., Crowley R. et al. FASN inhibition targets multiple drivers of NASH by reducing steatosis, inflammation and fibrosis in preclinical models // Sci. Rep. – 2022. – Vol. 12, No. 1. – P. 15661.
199. Zhou M., Konigsberg WH., Hao C., Pan Y., Sun J., Wang X. Bioactivity and mechanisms of flavonoids in decreasing insulin resistance // J. Enzyme Inhib. Med. Chem. – 2023. – Vol. 38, No. 1. – P. 2199168.
200. Verma K., Jaiswal R., Paliwal S., Dwivedi J., Sharma S. An insight into PI3k/Akt pathway and associated protein–protein interactions in metabolic syndrome: a recent update // J. Cell. Biochem. – 2023. – Vol. 124, No. 7. – P. 923–942.
201. Liu Q., Wang P. P., Fu X., Chen C. Mechanistic Insights into Pancreatic Lipase Inhibition by Sugarcane Polyphenols: A Structural and Kinetic Study // Foods. – 2026. – Vol. 15, No. 9. – P. 1480.
202. Wong T. Y., Tan Y. Q., Lin S. M., Leung L. K. Apigenin and luteolin display differential hypocholesterolemic mechanisms in mice fed a high-fat diet // Biomed. Pharmacother. – 2017. – Vol. 96. – P. 1000–1007.

203. Wang H., Liu X., Wang C., Yu S., Yang X., Cao X., Luo M., Liu S., Zhang C. Natural active botanical metabolites: targeting AMPK signaling pathway to treat metabolic dysfunction-associated fatty liver disease // Front. Pharmacol. – 2025. – Vol. 16. – P. 1611400.
204. Achi N. K., Onyeabo C., Enyidiya O. J., Chibuzor F., Onyinyechi S. Hepatoprotective effect of plant extracts against carbon tetrachloride-induced liver injury // J. Acute Med. – 2021. – Vol. 11, № 2. – P. 43–52.
205. Alhusaini A., Fadda L., Hasan I. H. et al. Arctium lappa Root Extract Prevents Lead-Induced Liver Injury by Attenuating Oxidative Stress and Inflammation, and Activating Akt/GSK-3β Signaling // Antioxidants (Basel). – 2019. – Vol. 8, No. 12. – Art. 582.
206. Li L., Zhang Y., Xiao F., Wang Z., Liu J. Arctiin attenuates lipid accumulation, inflammation and oxidative stress in nonalcoholic fatty liver disease through inhibiting MAPK pathway // Qual. Assur. Saf. Crops Foods. – 2022. – Vol. 14, No. 4. – P. 136–145.
207. Zhou Y., Xia L., Yao W., Han J., Wang G. Arctiin Antagonizes Triptolide-Induced Hepatotoxicity via Activation of Nrf2 Pathway // Biomed. Res. Int. – 2020. – Vol. 2020. – Art. 2508952.
208. Fujii T., Fuchs B. C., Yamada S. et al. Mouse model of carbon tetrachloride induced liver fibrosis: Histopathological changes and expression of CD133 and epidermal growth factor // BMC Gastroenterol. – 2010. – Vol. 10. – Art. 79.
209. Aitynova A., Sevastre B., Ielciu I. et al. Hepatoprotective Activity and Oxidative Stress Reduction of an Arctium tomentosum Mill. Root Extract in Mice with Experimentally Induced Hepatotoxicity // Livers. – 2024. – Vol. 4, № 4. – P. 696–710.
210. Ezhilarasan D. Herbal therapy for liver diseases: A review of mechanisms of action and therapeutic potential // Phytother. Res. – 2018. – Vol. 32, № 6. – P. 961–972.
211. Zhang L., Liu C., Yin L. et al. Mangiferin relieves CCl4-induced liver fibrosis in mice // Sci. Rep. – 2023. – Vol. 13. – Art. 4172.
212. Yoshioka H., Nonogaki T., Fukaya S. et al. Sasa veitchii extract protects against carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in mice // Environ. Health Prev. Med. – 2018. – Vol. 23. – Art. 49.
213. Meng X., Tang G. Y., Liu P. H., Zhao C. J., Liu Q., Li H. B. Antioxidant activity and hepatoprotective effect of 10 medicinal herbs on CCl4-induced liver injury in mice // World J. Gastroenterol. – 2020. – Vol. 26, No. 37. – P. 5629–5645.
214. Xue H., Wei M., Ji L. Chlorogenic acids: A pharmacological systematic review on their hepatoprotective effects // Phytomedicine. – 2023. – Vol. 118. – Art. 154961.
215. Jang E. Hyperoside as a Potential Natural Product Targeting Oxidative Stress in Liver Diseases // Antioxidants (Basel). – 2022. – Vol. 11, No. 8. – P. 1437.

216. Zhang Q., Zhang X. F. Hyperoside decreases the apoptosis and autophagy rates of osteoblast MC3T3-E1 cells by regulating TNF-like weak inducer of apoptosis and the p38mitogen activated protein kinase pathway // Mol. Med. Rep. – 2019. – Vol. 19, No. 1. – P. 41–50.
217. Caporali S., De Stefano A., Calabrese C., Giovannelli A., Pieri M., Savini I., Tesauro M., Bernardini S., Minieri M., Terrinoni A. Anti-Inflammatory and Active Biological Properties of the Plant-Derived Bioactive Compounds Luteolin and Luteolin 7-Glucoside // Nutrients. – 2022. – Vol. 14, No. 6. – P. 1155.
218. Ysrafil Y., Sapiun Z., Slamet NS., Mohamad F., Hartati H., Damiti SA., Alexandra FD., Rahman S., Masyeni S., Harapan H. et al. Anti-inflammatory activities of flavonoid derivates // ADMET DMPK. – 2023. – Vol. 11, No. 3. – P. 331–359.
219. Boriero R., Butturini E., Carcereri de Prati A. et al. The anti-STAT1 polyphenol myricetin inhibits M1 microglia activation and interferes with STAT1 phosphorylation // FEBS J. – 2021. – Vol. 288, No. 12. – P. 41–50.
220. Taheri Y., Suleria H. A. R., Martins N. et al. Myricetin bioactive effects: moving from preclinical evidence to potential clinical applications // BMC Complement. Med. Ther. – 2020. – Vol. 20, No. 1. – P. 241.
221. Almatroodi S. A., Rahmani A. H. Unlocking the Pharmacological Potential of Myricetin Against Various Pathogenesis // Int. J. Mol. Sci. – 2025. – Vol. 26, No. 9. – P. 4188.
222. Abdel-Rasol M. A., Abbas R. A. R., El-Sayed W. M. Tilianin: pharmacological potential, mechanisms of action, and future perspectives in traditional and modern medicine // Chin. Med. – 2025. – Vol. 20, No. 1. – P. 194.
223. Wang J., An W., Wang Z., Zhao Y., Han B., Tao H., Wang J., Wang X. Vanillin Has Potent Antibacterial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Activities In Vitro and in Mouse Colitis Induced by Multidrug-Resistant Escherichia coli // Antioxidants. – 2024. – Vol. 13, No. 12. – P. 1544.
224. Makni M., Chtourou Y., Fetoui H., Garoui el M., Boudawara T., Zeghal N. Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective properties of vanillin in carbon tetrachloride-treated rats // Eur. J. Pharmacol. – 2011. – Vol. 668, No. 1-2. – P. 133–139.

Приложение А
АКТ ВНЕДРЕНИЯ

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени АЛЬ-ФАРАБИ

СОГЛАСОВАНО
Проректор по научно-инновационной деятельности
_____Ибраимов М.К.
«_____»_____2026г.

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по академическим вопросам, председатель комиссии
_____Галеева А.К.
_____2026 г.

АКТ
о внедрении завершенной научно-исследовательской работы (этапа) в учебный процесс

Комиссия Казахского национального университета имени аль-Фараби в составе: председатель: Галеева А.К. – проректор по академическим вопросам, члены: директор департамента по академическим вопросам Рахимбекова Б.К., директор департамента по науке и инновационной деятельности Тастамбек Қ.Т., руководитель офиса организации образовательного процесса Кожабергенова Ж.Б., декан факультета биологии и биотехнологии Нармуратова М.Х., председатель Академического комитета по качеству преподавания и обучения факультета биологии и биотехнологии Естемірова Г.Ә., заведующий кафедрой зоологии, гистологии и цитологии Шарахметов С.Е. составили настоящий акт о том, что в 2025/2026 учебном году на кафедре зоологии, гистологии и цитологии внедрены результаты диссертационной работы PhD-докторанта Айтыновой А.Е. на тему: «Исследование биологической активности фитопрепарата из лопуха войлочного (*Arctium tomentosum* Mill.)»

№ п/п	Форма внедрения (наименование нового курса, спецкурса, раздела лекции, лаб.работы, установки, учебные пособия и т.п.); курс, специальность	Объем внедрения (количество работ, лекционных часов)	Краткое содержание внедренной работы
1	Дисциплина «Биология клетки и гистология» 9 кредитов, 2 курс бакалавриата по образовательной программе	Лекция – 2 часа «Клеточный цикл. Регуляция клеточного цикла. Клеточное деление (митоз и мейоз)»	Внедрены результаты исследований антимикробной активности фитопрепарата из корня лопуха войлочного (*Arctium tomentosum* Mill.). Рассмотрены механизмы токсического действия фитопрепарата на клеточное деление грамположительных и грамотрицательных

	«6В05102 - Биология»		микроорганизмов и дрожжеподобных грибов.
2	Дисциплина «Биология клетки и гистология» 9 кредитов, 2 курс бакалавриата по образовательной программе «6В05102 - Биология»	Лабораторное занятие - 4 часа «Митоз растительной и животной клетки. Мейоз. Строение мейотических хромосом»	На лабораторном занятии студентами рассмотрены на чашках Петри, зарисованы и проанализированы рост колоний указанных выше микроорганизмов и дрожжей в контроле и при действии фитопрепарата из корня лопуха войлочного (*Arctium tomentosum* Mill.), полученных в ходе выполнения диссертационной работы Айтыновой А.Е.
3	Дисциплина «Биология клетки и гистология» 9 кредитов, 2 курс бакалавриата по образовательной программе «6В05102 - Биология»	Лекция – 2 часа «Клеточная гибель. Некроз и апоптоз».	Студентам продемонстрированы примеры развития деструктивных процессов (дистрофия, некроз и апоптоз) в клетках разных органов у мышей на модели метаболического синдрома и улучшения их гистоструктуры при применении фитопрепарата из корня лопуха войлочного (*Arctium tomentosum* Mill.).
4	Дисциплина «Биология клетки и гистология» 9 кредитов, 2 курс бакалавриата по образовательной программе «6В05102 - Биология»	Лабораторное занятие - 4 часа «Морфологические различия процессов некроза и апоптоза»	На лабораторном занятии студентами были изучены гистологические препараты легких, печени, почек, семенников и яичников мышей с метаболическим синдромом (МС) и при лечении фитопрепаратом. При этом выявлены и проанализированы морфологические различия процессов некроза и апоптоза при МС и приеме фитопрепарата.
5	Дисциплина «Биология клетки и гистология» 9 кредитов, 2 курс бакалавриата по образовательной программе «6В05102 - Биология»	Лекция – 2 часа «Эпителиальные ткани. Строение. Классификация. Однослойные эпителии. Многослойные эпителии»	Внедрены результаты исследований цитотоксического действия гепатотоксина CCl_4, показаны изменения в эпителиальной выстилке органов ЖКТ, в том числе паренхимы печени и почек, данные биохимических показателей в сравнении с положительным действием фитопрепарата из корня лопуха войлочного (*Arctium tomentosum* Mill.).

6.	Дисциплина «Патология клеток и тканей» 5 кредитов, 4 курс бакалавриата по специальности «5В05102 - Биология»	Лекция – 2 часа Тема: « Патология цитоплазмы и клеточных мембран»	Студентам были продемонстрированы результаты исследований антиоксидантной активности фитопрепарата из корня лопуха войлочного (*Arctium tomentosum* Mill.) в результате действия полифенолов в его составе и возможности сохранения целостности мембран при воздействии токсических веществ.

Материалы к настоящему акту рассмотрены на заседании Академического комитета по качеству преподавания и обучения факультета биологии и биотехнологии (протокол № 3 от 02.03.2026г.)

Члены комиссии:

Директор департамента по академическим вопросам _____ Рахимбекова Б.К.

Директор департамента по науке и инновационной деятельности работе _____ Тастамбек К.Т.

Руководитель офиса организации образовательного процесса _____ Кожабергенова Ж.Б.

Декан факультета биологии и биотехнологии _____ Нармуратова М.Х.

Председатель Академического комитета по качеству преподавания и обучения _____ Естемірова Г.Э.

Заведующий кафедры зоологии, гистологии и цитологии _____ Шарахметов С.Е.

Приложение Б

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ
ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ
УНИВЕРСИТЕТІ
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ
БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАКУЛЬТЕТІ

050038, Алматы қаласы, әл-Фараби даңғылы,71
Тел. 377-33-34 кос.1202

РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН
КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
ИМ. АЛЬ-ФАРАБИ

ФАКУЛЬТЕТ БИОЛОГИИ И
БИОТЕХНОЛОГИИ

050038, г. Алматы, проспект аль-Фараби, 71
Тел. 377-33-34 доп.1202

****

……№…….. " ….." ……2022г.

АКТ передачи

в Гербарный фонд РГП на ПХВ «Институт ботаники и фитоинтродукции» КЛХЖМ МЭГПР РК гербарного образца Лопуха войлочного (*Arctium tomentosum* Mill.), рода – Лопух (*Arctium* L.), семейства – Сложноцветные *(Asteraceae* Bercht. & J.Presl)

Настоящим актом подтверждаем, что в результате выполнения диссертационной работы на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности «8D05101 – Биология» по теме: «Исследование биологической активности фитопрепарата из лопуха войлочного (*Arctium tomentosum Mill.*)» докторантом КазНУ имени аль-Фараби – Айтыновой Арайлым Елдосқызы был собран и далее передан на хранение в Гербарный фонд РГП на ПХВ «Институт ботаники и фитоинтродукции» КЛХЖМ МЭГПР РК 1 гербарный образец Лопуха войлочного (*Arctium tomentosum* Mill.*)* рода Лопух (*Arctium* L.).

Генеральный директор,
академик КазНАЕН, д.б.н. _____ Ситпаева Г.Т.

Зав. лабораторией флоры
высших растений, к.б.н. _____ Веселова П.В.

Образец сдала:
PhD-докторант 2-го курса _____ Айтынова А.Е.

Акт передачи

в Гербарный фонд РГП на ПХВ «Институт ботаники и фитоинтродукции» КЛХЖМ МЭГПР РК гербарного образца Лопуха войлочного (*Arctium tomentosum* Mill.), семейства Сложноцветных (*Asteraceae* Bercht & J.Presl) собранного в Аксайском ущелье, расположенном в западно-центральной части гор Заилийского Алатау докторантом Айтыновой Арайлым Елдосқызы 30 августа 2022 года.

Тема диссертационной работы: «Исследование биологической активности фитопрепарата из лопуха войлочного (*Arctium tomentosum* Mill.)».

№	Название вида	Семейство	Место сбора	Координаты местности	Дата сбора	Кол-во образцов, шт
1	Лопух войлочный (*Arctium tomentosum* Mill.)	Сложноцветные (*Asteraceae* Bercht. & J.Presl)	Западно-центральная часть гор Заилийского Алатау, Аксайское ущелье	N: 43° 08′ 51″ E: 76° 47′ 56″ 1151.6 н.у.м.	30.08.2022	1

Образцы собрала и сдала:
PhD-докторант Айтынова А.Е.

подпись

Образцы приняла:
к.б.н., зав. лабораторией флоры высших растений Веселова П.В.

подпись

ПРИЛОЖЕНИЕ В



ПРИЛОЖЕНИЕ Г

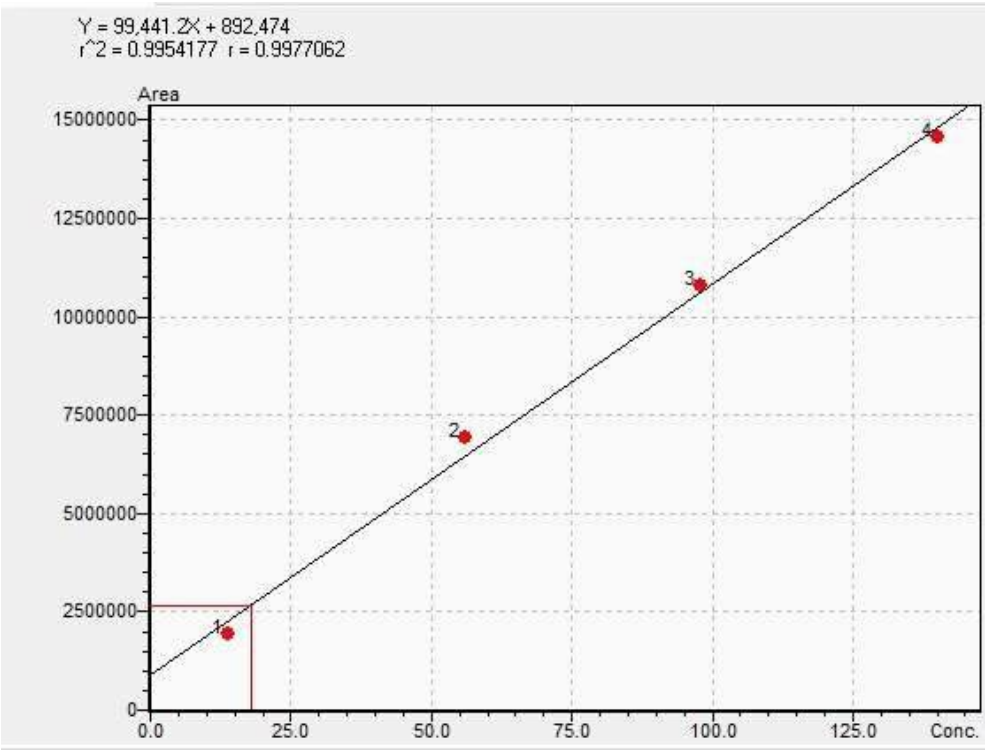


Рисунок Г.1 – Калибровочный график зависимости площади хроматографического пика от концентрации хлорогеновой кислоты для количественного определения методом ВЭЖХ

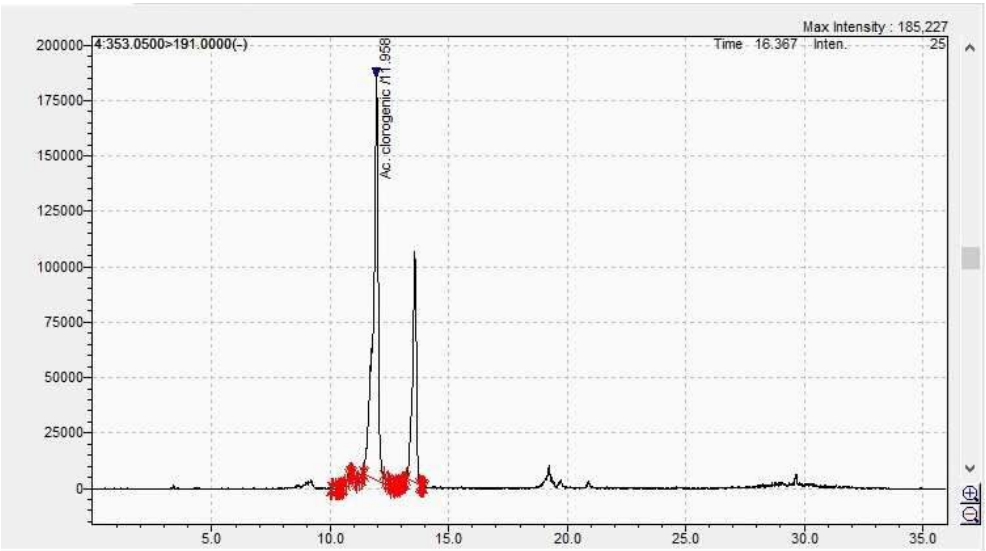


Рисунок Г.2 – Хроматограмма ВЭЖХ-МС фитопрепарата с идентифицированным пиком хлорогеновой кислоты

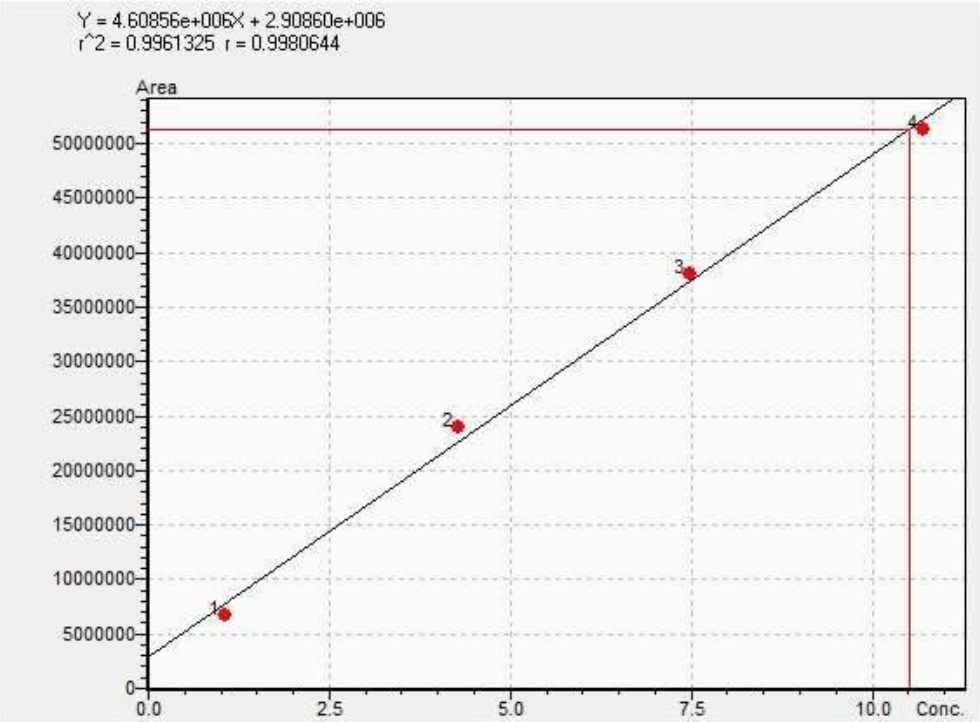


Рисунок Г.3 – Калибровочный график зависимости площади хроматографического пика от концентрации гиперозида для количественного определения методом ВЭЖХ

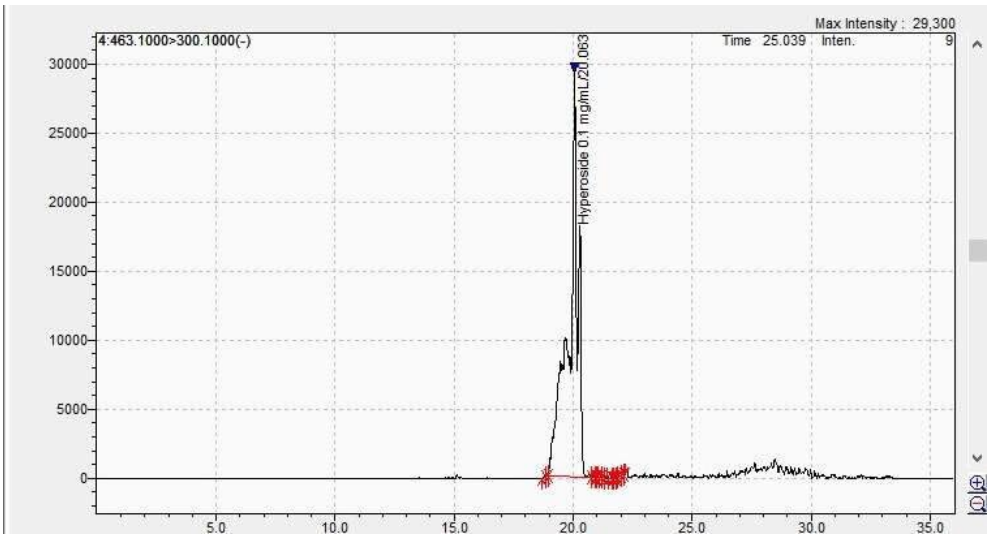


Рисунок Г.4 – Хроматограмма ВЭЖХ-МС фитопрепарата с идентифицированным пиком гиперозида

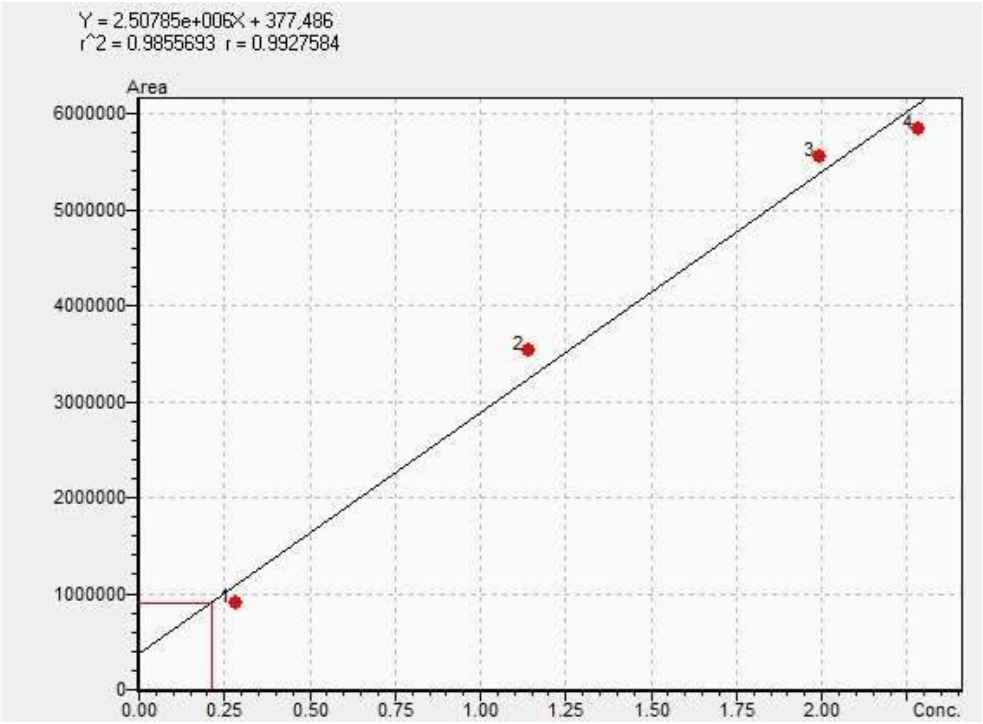


Рисунок Г.5 – Калибровочный график зависимости площади хроматографического пика от концентрации лютеолин-7-О-глюкозида для количественного определения методом ВЭЖХ

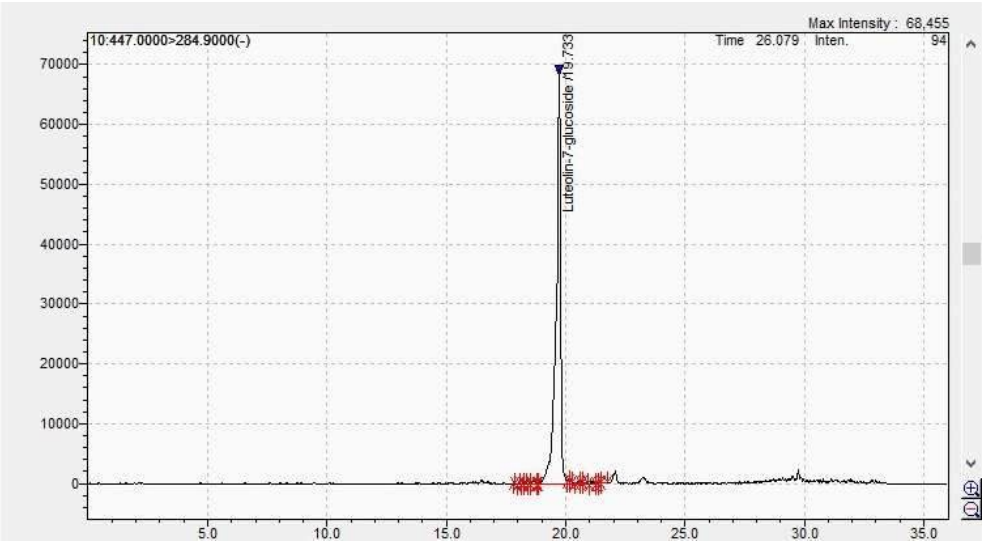


Рисунок Г.6 – Хроматограмма ВЭЖХ-МС фитопрепарата с идентифицированным пиком лютеолин-7-О-глюкозида

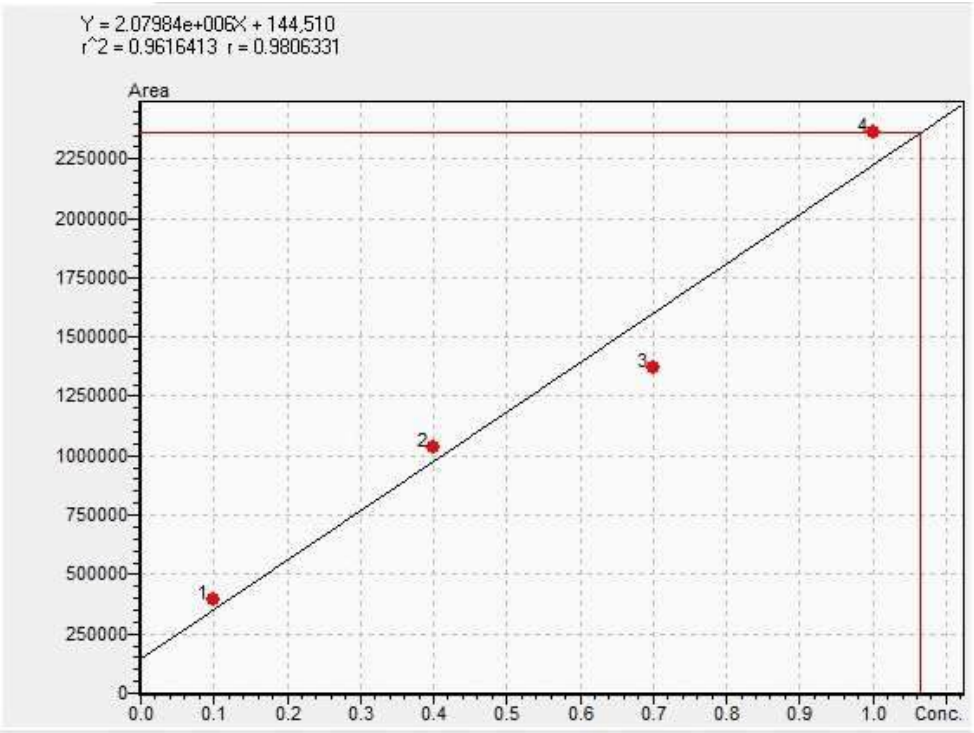


Рисунок Г.7 – Калибровочный график зависимости площади хроматографического пика от концентрации мирицетина для количественного определения методом ВЭЖХ

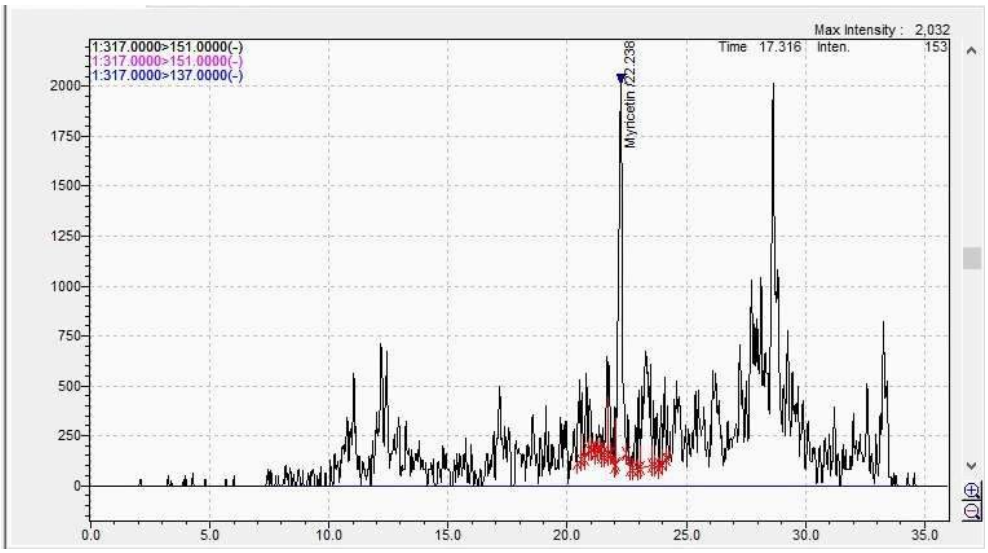


Рисунок Г.8 – Хроматограмма ВЭЖХ-МС фитопрепарата с идентифицированным пиком мирицетина

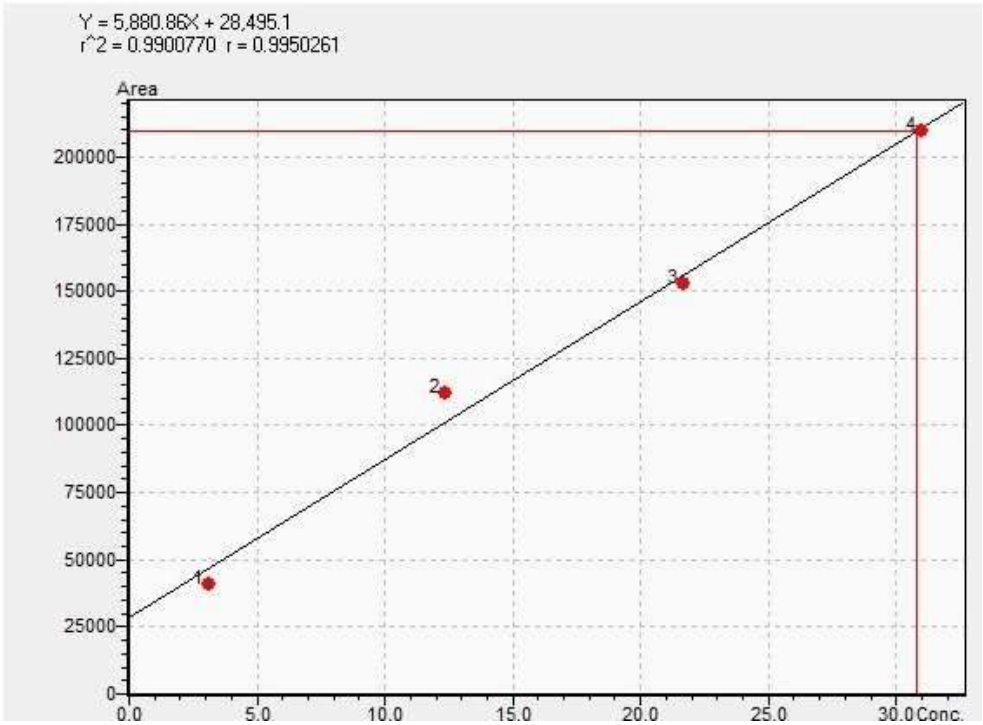


Рисунок Г.9 – Калибровочный график зависимости площади хроматографического пика от концентрации акацетин-7-О-глюкозида для количественного определения методом ВЭЖХ

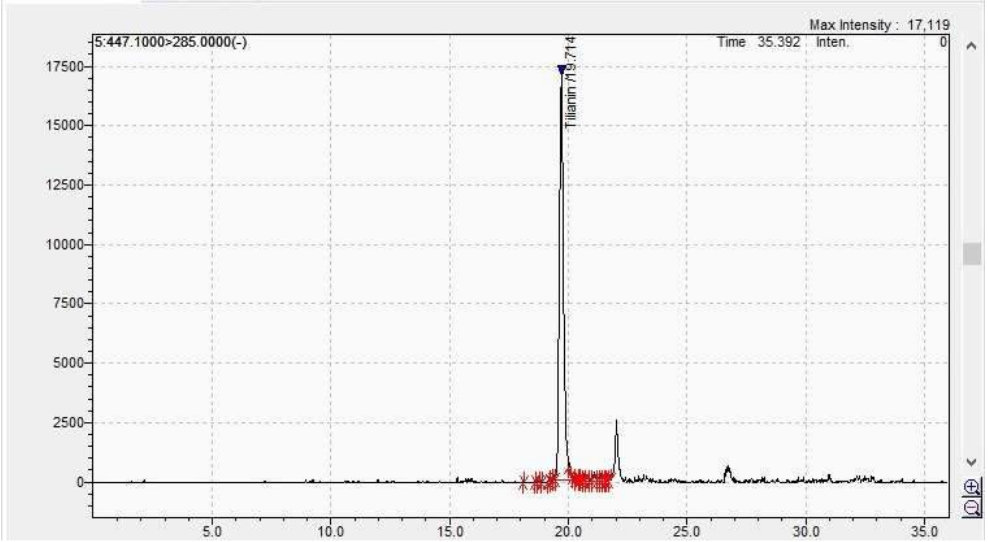


Рисунок Г.10 – Хроматограмма ВЭЖХ-МС фитопрепарата с идентифицированным пиком акацетин-7-О-глюкозида

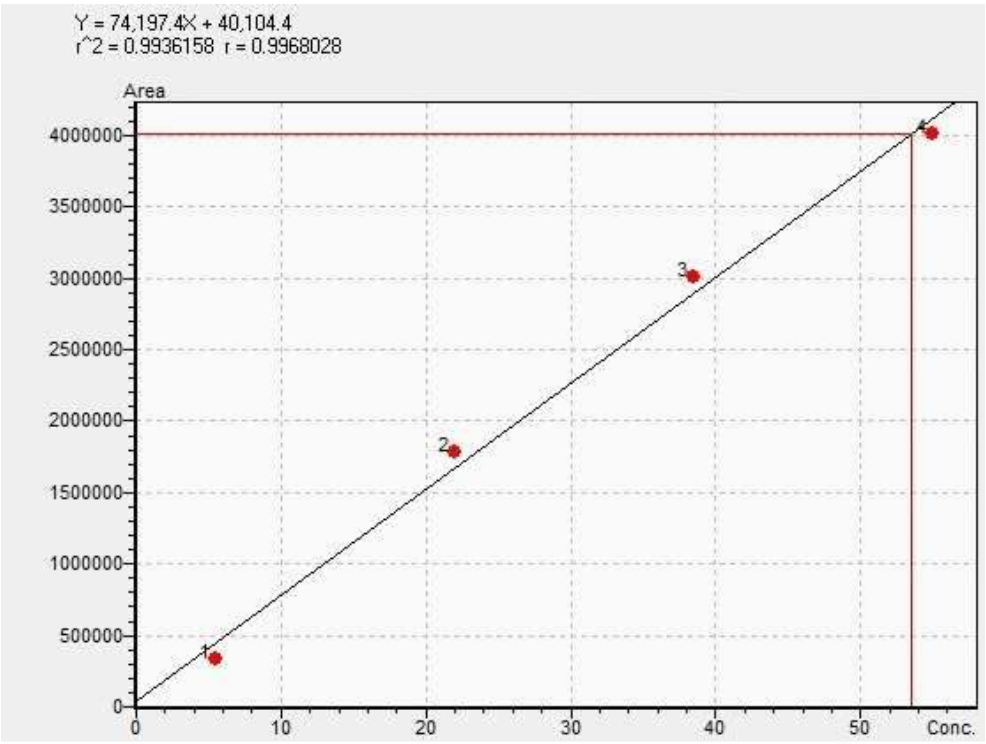


Рисунок Г.11 – Калибровочный график зависимости площади хроматографического пика от концентрации 4-гидрокси-3-метоксибензальдегида для количественного определения методом ВЭЖХ

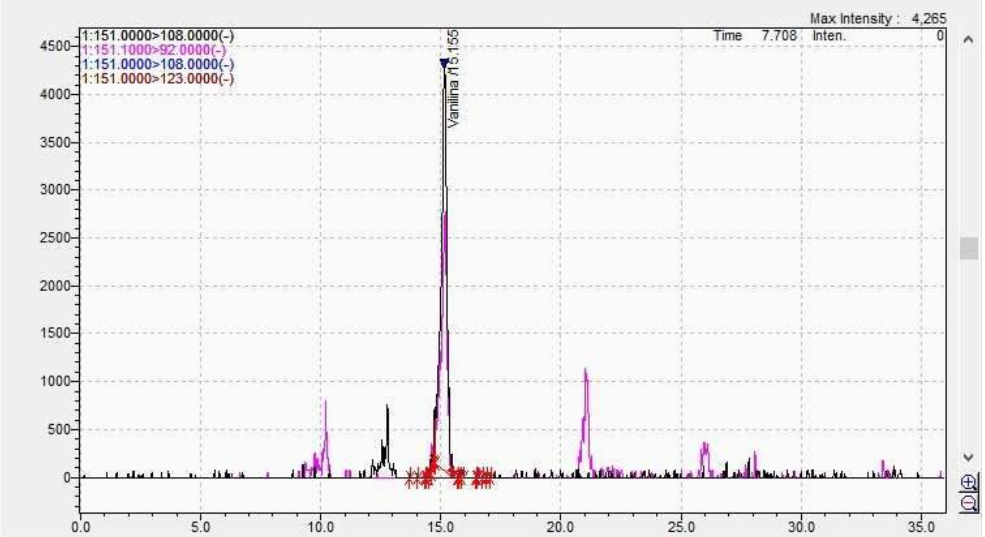


Рисунок Г.12 – Хроматограмма ВЭЖХ-МС фитопрепарата с идентифицированным пиком 4-гидрокси-3-метоксибензальдегида

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

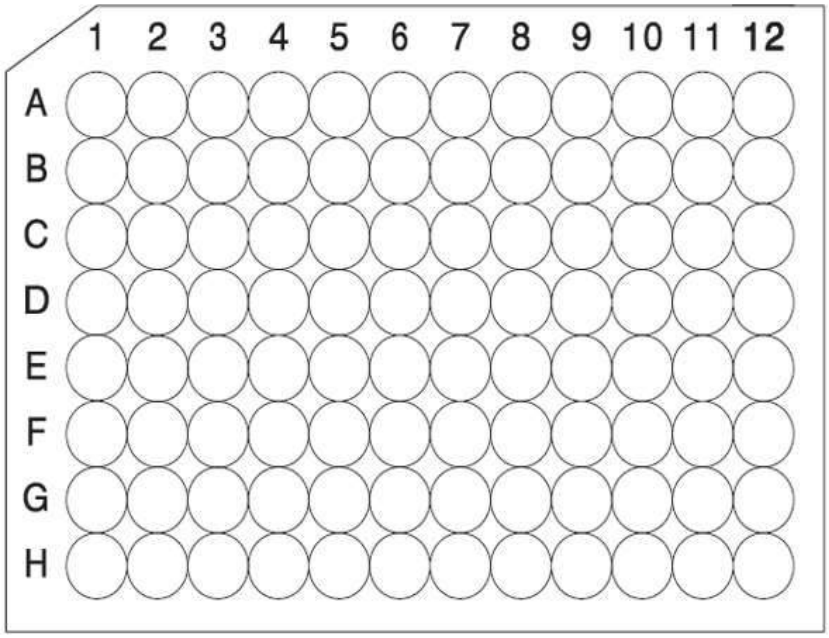


Рисунок Д.1 – Схема распределения клеточной суспензии и исследуемых концентраций фитопрепарата в 96-луночном микропланшете в МТТ-тесте

Таблица Д.1 – Расшифровка содержимого лунок и тестируемых концентраций фитопрепарата в МТТ-тесте

Ряд	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	К	К	К	С4	С4	С4	С8	С8	С8	С12	PBS
C	PBS	С1	С1	С1	С5	С5	С5	С9	С9	С9	С12	PBS
D	PBS	С2	С2	С2	С6	С6	С6	С10	С10	С10	С12	PBS
E	PBS	С3	С3	С3	С7	С7	С7	С11	С11	С11	С13	PBS
F	PBS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	С13	PBS
G	PBS	Б	Б	Б	-	-	-	-	-	-	С13	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Примечание: PBS – фосфатно-солевой буфер; К (контроль) – клетки + МТТ без фитопрепарата; Б (бланк-раствор) – среда + МТТ без клеток; С1-С13 (опыт) клетки + фитопрепарат + МТТ; «-» – резервные пустые лунки планшета, заполненные стерильной средой.

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

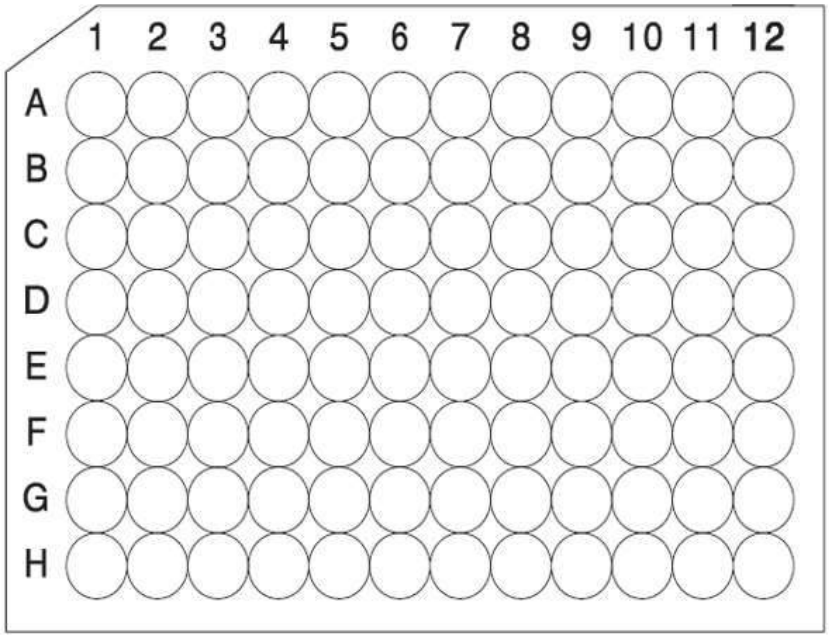


Рисунок Е.1 – Схема распределения серийных микроразведений фитопрепарата, референтных антимикробных средств и контролей в 96-луночном микропланшете в антимикробном тесте

Таблица Е.1 – Расшифровка содержимого лунок и тестируемых концентраций фитопрепарата в антимикробном тесте

Ряд	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8	№9	№10	PBS
C	PBS	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8	№9	№10	PBS
D	PBS	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8	№9	№10	PBS
E	PBS	№11	№12	№13	№14	№15	№16	№17	№18	№19	№20	PBS
F	PBS	№11	№12	№13	№14	№15	№16	№17	№18	№19	№20	PBS
G	PBS	№11	№12	№13	№14	№15	№16	№17	№18	№19	№20	PBS
H	PBS	№21	№21	№21	№22	№22	№22	-	ДМСО	ДМСО	ДМСО	PBS

Примечание: PBS – фосфатно-солевой буфер; ДМСО – отрицательный контроль; №1-№22 – последовательная цепочка двукратных разведений фитопрепарата; «-» – резервные пустые лунки планшета, заполненные стерильной средой.

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

ИНФЕКЦИЯҒА ҚАРСЫ ПРЕПАРАТТАРДЫҢ ҒЫЛЫМИ ОРТАЛЫҒЫ
SCAID

«Инфекцияға қарсы препараттардың ғылыми орталығы»
акционерлік қоғамы
050008, Алматы қаласы,
Әуезов көшесі, 84
Тел./факс:+7(727) 266 52 29
e-mail: scaid@scaid.kz

Акционерное общество
«Научный центр
противоинфекционных
препаратов»
050008, город Алматы,
ул. Ауэзова, 84
Тел./факс:+7(727) 266 52 29
e-mail: scaid@scaid.kz

«Scientific Center for
Anti-infectious Drugs»
Joint Stock Company
050008, Almaty city,
Auezov street, 84
Tel./fax:+7(727) 266 52
e-mail: scaid@scaid.kz

21.02.2022 № 04-03/32

16 февраля 2022 года
Протокол № 21/1

Заключение Комиссии по биоэтике

Название научно-исследовательской работы: «Исследование биологической активности фитопрепарата из лопуха войлочного (*Arctium tomentosum* Mill.)».

Заявитель: научный сотрудник лаборатории фармакологии и токсикологии, АО «Научный центр противоинфекционных препаратов» Айтынова Арайлым Елдосқызы.

Решение: **одобрить заявку научного исследования**.

Председатель комиссии **Ж. Шалабаев**

№ 4721