

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ, ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ, ՄՇԱԿՈՒՅԹԻ ԵՎ ՍՊՈՐՏԻ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՂԱԶԱՐՅԱՆ ՇՈՒՇԱՆԻԿ ԱՐՄԵՆԻ

ԴԵՂԱԲՈՒՅՍԵՐԻ ԼՈՒԾԱՄԶՎԱԾՔՆԵՐԻ ԵՎ ՄԵՏԱՂՆԵՐԻ ՆԱՆՈՄԱՍՆԻԿՆԵՐԻ
ՀԱՄԱՏԵՂ ԱԶԴԵՅՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԼՅԱՐԴԻ ՑԻՌՈԶԻ
ԶԱՐԳԱՑՄԱՆ ԿԱՆԽԱՐԳԵԼՄԱՆ ԵՎ ԲՈՒԺՄԱՆ ՀԱՄԱՐ

Գ.00.04 – Կենսաքիմիա մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2022

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ, КУЛЬТУРЫ И СПОРТА РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

КАЗАРЯН ШУШАНИК АРМЕНОВНА

ИССЛЕДОВАНИЕ СОВМЕСТНОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ
РАСТЕНИЙ И НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ
РАЗВИТИЯ ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.04 – Биохимия

ЕРЕВАН – 2022

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Հայ-Ռուսական համալսարանում

Գիտական ղեկավար՝

կեն. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր

Հ.Ռ. Վարդապետյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր

Գ.Ս. Վարդանյան

կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր

Մ.Ա. Սիմոնյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

ՀՀ ԳԱԱ Լ.Օրբելու անվ. Ֆիզիոլոգիայի
ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2022թ. դեկտեմբերի 9-ին ժամը 14⁰⁰-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈԿ-ի Կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2022թ. հոկտեմբերի 27-ին:

051 Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար

կենս. գիտ. դոկտոր, դոցենտ

Մ.Ա. Փարսադանյան

Тема диссертации утверждена в Российско-Армянском университете

Научный руководитель:

док. биол. наук, профессор

Г.Р. Вардапетян

Официальные оппоненты:

доктор биол. наук, профессор

Г.С. Варданян

доктор биол. наук, профессор

М.А. Симонян

Ведущая организация:

Институт физиологии им. Л.Орбели НАН РА

Защита диссертации состоится 9-го декабря 2022г в 14⁰⁰ часов на заседании Специализированного совета 051 по Биофизике ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукиана 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 27-го октября 2022г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051

доктор биол. наук, доцент

М.А.Парсаданян

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Согласно отчету Всемирной организации здравоохранения, в 2017 году причиной 1,32 млн смертей во всем мире явился цирроз печени (ЦП), что составляет 2,4% от числа всех смертей, при этом наибольший прирост смертности от ЦП пришелся на Литву, Украину, Беларусь, Россию, Казахстан, Эстонию, Латвию и Армению [Zhaietal., 2021]. По сравнению с 1990 г, когда смертность составляла 1,9%, наблюдается рост данного показателя с 16,5 до 21,0 случаев на 100.000 популяции в 2017г. При этом уменьшился средний возраст пациентов с диагнозом ЦП (24±3 года у женщин и 35±2 года у мужчин в Восточной Европе) [Roth et al., 2018]. ЦП чаще всего диагностируется у наиболее трудоспособной возрастной категории населения, что является серьёзной медицинской и социально-экономической проблемой многих стран. Помимо больших экономических затрат, необходимых для лечения ЦП, имеет место и серьёзное ухудшение качества жизни пациентов с данным заболеванием [Ge et al., 2016]. Несмотря на развитие современных диагностикумов, ЦП практически невозможно диагностировать на ранних стадиях, что приводит к ограничению методов лечения и высокому проценту смертности.

Хотя причины развития неинфекционного цирроза многофакторны [Engelmann et al., 2021], решающую роль в инициации процесса играют постоянные источники клеточных стрессов, включая окислительный стресс [Ling-Zu et al., 2019], апоптоз [Leroux et al., 2012], бактериальные липополисахариды (LPS) кишечника [Van Hul et al., 2009], являющиеся триггерами воспалительного ответа и прогрессирующего повреждения печени, в итоге приводящего к циррозу [Roehlen et al., 2020]. Опасность данного заболевания состоит в том, что оно начинает клинически проявляться на поздних стадиях, когда уже невозможно медикаментозное лечение [Fleming et al., 2010]. На сегодняшний день актуальным является вопрос нахождения потенциальных профилактических и терапевтических препаратов, против процессов инициации и развития ЦП, а также необходимости комплексного подхода в решении этой глобальной проблемы.

Эти препараты должны обладать мультимодальностью - иметь антирадикальную, способность для нейтрализации окислительного стресса [Kisseleva et al., 2021]; противомикробную, для подавления роста бактерий, LPS которых приводят к гиперактивации печеночных звездчатых клеток и фиброгенезу [Li et al., 2017]; противоапоптотическую активность [Wree et al., 2014]; противовоспалительные свойства [Muriel et al., 2009]; высокую биосовместимость. В поисках потенциальных препаратов, обладающих всеми из перечисленных свойств, современная медицина все чаще прибегает к исследованию лекарственных растений, наличие и уровень выраженности фармакологической активности которых определяется количественным и качественным составом присутствующих в них биоактивных компонентов, таких как фенольные и полифенольные вторичные метаболиты [Twaïj et al., 2022]. Все эти фитоконпоненты имеют широкий спектр биологических активностей, таких как противомикробная, противовоспалительная, антиоксидантная и др. [Rafidah et al., 2016]. Показана эффективность флавоноидов и в лечении гепатобилиарной дисфункции, которая также может быть причиной ЦП [Garcia et al., 2018], а некоторые растительные вторичные метаболиты уже используются в качестве лекарственных препаратов при лечении множества болезней печени (карсил, ЛИВ-52 и др.).

Большинство из вышеуказанных биологических активностей вторичных метаболитов *in vivo* исследованиях обладают меньшей выраженностью в связи с их биотрансформацией, образованием менее активных метаболитов и понижением биодоступной концентрации [Walle, 2004]. Решение этих проблем возможно за счет применения различных наночастиц

(НЧ), которые можно использовать также в качестве носителей различных терапевтических препаратов. При этом НЧ должны обладать некоторыми свойствами, такими как специфичность, селективность, минимальная токсичность, стабильность, биосовместимость и биодоступность [Casajus et al., 2018]. Наиболее изученными НЧ в данном аспекте на сегодняшний день являются наноразмерные серебро и оксиды железа [McShan 2014]. Серебро известно своим антибактериальным действием и изредка использовалось для профилактики и борьбы с различными бактериальными инфекциями [Liao et al., 2019]. НЧ оксидов железа обладают магнитными свойствами, благодаря чему управляемы внешним магнитным полем, проявляют минимальную токсичность и считаются наиболее предпочтительными для различных биомедицинских приложений [Alangari et al., 2022].

При этом НЧ обладают антимикробными, цитотоксическими/цитостатическими, противоопухолевыми, иммуномодулирующими, противовоспалительными и др. свойствами, что может внести свою роль в суммарно проявляемый терапевтический эффект при совместном с растительными вторичными метаболитами воздействию [Nemeg 2017]. При этом перспективным является использование не отдельных вторичных компонентов, а растительных экстрактов в комплексе с НЧ, которые могут увеличивать спектр терапевтического действия обоих.

Целью данной работы является синтез НЧ и оценка совместного их с экстрактами некоторых лекарственных растений действия для лечения и профилактики развития цирроза печени (стадия жировой дистрофии (ЖДП)) белых беспородных крыс Wistar. Для достижения данной цели, нами были поставлены следующие задачи:

- синтез стабильных биосовместимых НЧ оксидов железа;
- скрининг экстрактов лекарственных растений с высоким содержанием флавоноидов, выраженными антирадикальными свойствами;
- детекция мажорных флавоноидов в наиболее активных экстрактах;
- оценка *in vitro* и *in vivo* проявления цитотоксичных свойств наиболее активных экстрактов, их мажорных флавоноидов, НЧ металлов, а так же их совместного применения; селекция наименее цитотоксичных из них;
- получение животной модели ЖДП/ЦП;
- определение профиля действия наиболее активных экстрактов, их мажорных флавоноидов, НЧ металлов, а так же их комплексов при лечении и профилактике развития цирроза печени на биохимические маркеры функционирования печени (АЛТ, АСТ, ГГТ, ЩФ); показатели липидного обмена (ЛПВП, ЛПНП, общий холестерин); показатели белкового обмена (альбумин, общий белок); активность печеночной ферментативной антиоксидантной системы (ПО); морфологические показатели состояния печеночной ткани.

Научная новизна и практическая ценность. В рамках данной диссертационной работы впервые были исследованы антирадикальные свойства и общее содержание флавоноидов в водных и водно-этанольных экстрактах широкого спектра различных лекарственных растений прорастающих в Армении, среди которых *Rhynchosorys orientalis* - эндемик Кавказского региона и Армянского нагорья. Впервые было показано, что мажорным флавоноидом в исследованных экстрактах армянских лекарственных растений является рутин. Впервые были оптимизированы условия синтеза и конгрегации биосовместимых НЧ Fe₃O₄ сферической формы диаметром 4-24 нм с парамагнитными свойствами. Была выявлена способность рутина, 70% и 96% этанольных экстрактов *Téucrium polium* потенцировать антибактериальные свойства коммерческих НЧ Ag (ООО «Наноиндустрия», Россия) против грам-положительных *Staphylococcus aureus* MDC5233 и

грам-отрицательных бактерий *Escherichia coli* K-12. Было показано, что биосовместимые НЧ Fe_3O_4 проявляют более выраженный гепатопротекторный эффект, нежели лекарственный препарат карсил. Выявлено, что биосовместимые НЧ Fe_3O_4 и 70% этанольный экстракт *T.polium*, в отдельности и при совместном воздействии на модель ЖДП приводят к нормализации некоторых показателей функционирования печеночной ткани и предотвращают дальнейшее развитие ЖДП в фиброз и далее в цирроз.

На основании полученных в данной работе результатов НЧ Fe_3O_4 могут быть рекомендованы для дальнейших исследований в качестве потенциальных гепатопротекторных агентов, эффект которых превышает таковой карсила. Полученные данные могут быть использованы в специальных лекционных курсах для студентов соответствующих кафедр ЕГУ, ЕГМУ, РАУ, а также в научных лабораториях по биохимии, медицинской биохимии, биофизике, занимающихся исследованием особенностей воздействия ксенобиотиков на морфофункциональные показатели печеночной ткани. В дальнейшем исследованные биосовместимые НЧ в комплексе с некоторыми растительными экстрактами можно рассматривать как потенциальные терапевтические агенты в профилактике и лечении ЖДП.

На защиту выносятся следующие основные положения:

- Выявлены наиболее эффективные экстрагенты обеспечивающие высокий выход фенолов, в частности флавоноидов и коррелятивные связи с их содержанием и высокой антирадикальной активностью исследованных растительных экстрактов.
- Обнаружены антимикробные свойства некоторых экстрактов и НЧ Ag против бактерий *E. coli* K12 и *S.aureus* MDC5233.
- Выявлена биосовместимость парамагнитных НЧ Fe_3O_4 , которые как и 70% этанольный экстракт *T.polium* и рутин не проявляют цитотоксичность ни относительно эритроцитов (RBC тест), ни бактерий *E. coli* K12 и *S.aureus* MDC5233.
- Определены более выраженные гепатопротекторные свойства НЧ Fe_3O_4 при профилактическом воздействии.
- Обнаружено нормализующее действие НЧ Fe_3O_4 на активность АЛТ и показателей жирового обмена в терапевтической серии экспериментов.
- Выявлена ферментомиметическая пероксидазная активность НЧ Fe_3O_4 .
- Биосовместимые НЧ Fe_3O_4 сферической формы диаметром от 4 до 24 нм в дозировке 40 мг/кг, представлены в качестве потенциальных профилактических и терапевтических агентов при ЖДП/ ЦП белых беспородных крыс Wistar.

Апробация диссертационной работы. Основные результаты исследований и материалы работы были представлены на международных и республиканских конференциях: IX, X и XII Научная Годичная конференция РАУ (Армения, Ереван, 2014, 2015, 2017); XXV, XXVI, XXVII и XXVIII международная научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Россия, Москва, 2018, 2019, 2020 и 2021); III и V Международная Научная интернет конференция «Физико-химическая биология» (Россия, Ставрополь, 2016, 2018); “Biotechnology: science and practice” IV International Scientific Conference of Young Researchers (Armenia, Yerevan, 2016); 3-rd International Conference Health Technology Management (Chisinau, Moldova, 2016); 2nd International school for young scientists “Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine” (Russia, Moscow, 2017); Second Panarmenian Scientific Forum (Armenia, Yerevan, 2017); 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering (Republic of Moldova, Chisinau, 2019); 13th Meeting of the Slovenian Biochemical Society (Slovenia, Ljubljana, 2019); «Современные тенденции биохимии, радиационной и космической биологии: Великий Сисакян и значение его исследований» (Армения, Ереван,

2019); V International Conference of Biotechnology and Health (Armenia, Yerevan, 2020); 5th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering (Republic of Moldova, Chisinau, 2021); The annual International Conference Laser Physics 2021 (Armenia, Yerevan, 2021).

По теме диссертационной работы опубликовано 6 статей и 2 тезиса.

Объем и структура диссертационной работы. Диссертационная работа изложена на 111 страницах машинописного текста, состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 158 наименований. Работа содержит 8 таблиц и 30 рисунков.

ВВЕДЕНИЕ И ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Во введении обосновывается актуальность темы исследования, представляются степень ее разработанности, объект и предмет исследования, формулируются цели и задачи, теоретические, эмпирические, методологические основания исследования, обосновывается научная новизна, формулируются основные положения, выносимые на защиту, представляется теоретическая и практическая значимость исследования, включаются апробация результатов исследования и структура работы.

В обзоре литературы приводятся: описание основных механизмов развития цирроза печени, зависимости структурных особенностей фенолов растительного происхождения и проявляемых ими антибактериальных и антирадикальных свойств. Отдельная глава посвящена НЧ, сферам их биомедицинского применения и некоторым механизмам внутриклеточного действия НЧ Ag и НЧ Fe₃O₄.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в лаборатории «Аналитической биохимии и биотехнологий» на кафедре Медицинской биохимии и биотехнологии РАУ. Объектами исследования в представленной работе являются - коммерческий препарат Ag НЧ «Биоцидная добавка» (ОО «Наноиндустрия», Россия), синтезированные химическим методом НЧ Fe₃O₄, буферно-этанольные экстракты растений *R. orientalis*, *O. sanctum*, *O. araratum*, *P. vulgaris*, *A. millefolium*, *A. absinthium*, *T. polium*, *H. perforatum* и *L. nobilis*. Высушенные наземные части растений были любезно предоставлены из ботанической коллекции гербария лаборатории «Аналитической биохимии и биотехнологий» РАУ.

В качестве биологических моделей исследования профиля действия НЧ и их комплексов были выбраны штаммы дикого типа *Escherichia coli* K-12 и непатогенного *Staphylococcus aureus* MDC5233 (из коллекции кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии биологического факультета ЕГУ), кровь здоровых доноров (Гематологический центр им. проф Р. Еоляна), экспериментальная модель развития ЦП белых беспородных крыс Wistar, вызванная CCl₄ на стадии жировой дистрофии (ЖДП).

Эксперименты на животных проводились в полном соответствии с этическими принципами проведения биомедицинских исследований, отраженными в Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, одобренных комитетом по биомедицинской этике при Ереванском государственном медицинском университете. Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета, а также совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях, Страсбург, № 123, 18.03.1986.

Получение растительных экстрактов. Растение *L. nobilis* было собрано в июне-сентябре 2015 года в Грузии, г. Зугдиди, остальные - в июне-сентябре 2015 и 2016 годов в Армении в Котайкском, Гегаркуникском, Араратском, Армавирском и Тавушском марзах. Растительные экстракты были приготовлены, методикой описанной Казарян и соавторами [Казарян Ш.А. и др., 2017]. В качестве экстрагента применялись PBS буфер (рН 7.2) и 96% этанол с разбавлением до конечных концентраций - 25%, 50%, 70%. Для удобства обозначения далее в тексте используется следующее обозначение экстрактов: №% Эт *plant*, где №% Эт - процент этанола в экстрагенте, *plant* - растение, из которого данный экстракт был получен

Определение общего содержания флавоноидов. ОСФ определялось в кверцетиновом эквиваленте колориметрическим методом, основанным на способности Al^{3+} образовывать с флавоноидами и их гликозидами комплексы желтого цвета, детектируемыми при 430 нм [Казарян Ш.А. и др., 2017; Vardapetyan et al., 2014].

Определение антирадикальной активности экстрактов. АРА исследуемых экстрактов измеряли колориметрическим методом с использованием стабильного радикала ДФПГ [Vardapetyan et al., 2012b]. Из дозово-зависимых кривых АРА определяли концентрацию компонентов в образце, необходимую для тушения 50% радикала ДФПГ (IC_{50}) [Vardapetyan et al., 2014].

ВЭЖХ анализ растительных экстрактов. ВЭЖХ была произведена на хроматографе Waters Alliance 2695 (Милфорд, Америка) со спектрофотометрическим и диодно-матричным детекторами и программным обеспечением обработки данных MassLynx. Разделение компонентов экстракта проводилось на колонке C-18 (250x4mm с размером пор 4,5 нм) согласно протоколу, указанному Казарян Ш.А. и соавторами [Казарян и др., 2016]. В качестве детектируемых стандартов были использованы этанольные растворы следующих флавоноидов (с указанием длин волн детекции): кверцетин (371 нм), рутин (356 нм), апигенин (336 нм), кемпферол (364 нм), нарингенин (290 нм), генистеин (260 нм). Все указанные стандарты были использованы в концентрации 1 мг/мл.

Химический синтез наночастиц оксида железа (Fe_3O_4). Синтез проводился модифицированной формой копреципитационного метода с использованием олеиновой кислоты [Farsiyan et al., 2022]. Определение природы и формы НЧ было произведено с помощью электронограммы и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) (LEO-912 ab omega, Carl Zeiss, Германия). НЧ Fe_3O_4 имели округлую форму от 4 до 24 нм в диаметре и монокристаллическую структуру. Аг НЧ в составе препарата «Биоцидная добавка» (ООО «Наноиндустрия», Россия) имели сферическую форму с диаметром от 2 до 18 нм (0,21 мг/мл), а в качестве стабилизатора использовался ДСС (18,75 мг/мл).

Спектральный анализ образцов НЧ и их комплексов. Анализ спектров исследуемых образцов НЧ Fe_3O_4 , 70% Эт *T. polium*, рутина, а также их комплексов с НЧ Fe_3O_4 проводили при длинах волн от 300 до 800 нм на спектрофотометре UV-Vis 18 (MRC, Израиль).

Определение антибактериальной активности экстрактов и НЧ. Исследование проводили диск диффузионным методом против штамма дикого типа *Escherichia coli* K-12 и непатогенного *Staphylococcus aureus* MDC5233. Все экстракты были стандартизированы по содержанию рутина (0,76 мкг/мл), а концентрация НЧ составляла 1 мг/мл [Farsiyan et al., 2022; Khachatryan et al., 2019]. В качестве положительного контроля использовали раствор ампициллина (1 мг/мл), отрицательного – этанол [Kazaryan et al., 2021]. Зоны лизиса определяли в пикселях с помощью программы Image Repair 3.19 [Asatryan et al., 2007].

Определение цитотоксической активности образцов с помощью RBC-теста. Действие экстрактов и НЧ на эритроциты оценивалось их резистентностью. Изменение ОП

суспензии эритроцитов при 680 нм снимали через каждые 30 сек и через 24ч на спектрофотометре UV/Vis (JENWAY 6405).

Моделирование эксперимента на животных. Эксперименты проводились на половозрелых самцах белых беспородных крыс Wistar (190-210 г). Животные содержались на обычном пищевом и водном рационе при температуре $25\pm 2^\circ\text{C}$ $55\pm 5\%$ влажности и 12-и часовом цикле день/ночь. Модель ЦП на стадии ЖДП была получена внутрибрюшинным введением субтоксичных доз CCl_4 (0,794 г/кг) на каждый 4 день эксперимента на протяжении 60 дней [Kazaryan et al., 2019]. Определение воздействия НЧ Fe_3O_4 , 70% этанольным экстрактом *T. polium*, рутина и их комплексов на морфофункциональные характеристики печени проводилось в следующих сериях экспериментов в течение 2 месяцев: контрольная серия - исследование действия воздействующих агентов на здоровых животных; терапевтическая серия - исследование действия воздействующих агентов на экспериментальную модель цирроза печени на стадии ЖДП; профилактическая серия – исследование совместного с CCl_4 действия воздействующих агентов.

В каждой серии экспериментов животные были разделены на контроль и 6 экспериментальных групп по 3-4 особи в каждой, с введением следующих воздействующих агентов:

- контроль - 70% этанольно-буферный раствор,
- I группа - 70% Эт *T. polium*,
- II группа - рутин (1,87 мкг/кг),
- III группа – 70% Эт *T. polium* и НЧ Fe_3O_4 (40 мг/кг),
- IV группа - рутин (1,87 мкг/кг) и НЧ Fe_3O_4 (40 мг/кг),
- V группа – НЧ Fe_3O_4 (40 мг/кг),
- VI группа – лекарственный препарат «Карсил».

Дозировка вводимого 70% Эт *T. polium* рассчитывалась по содержанию рутина (1,87 мкг/кг), лекарственного препарата «Карсил» (7 мг/кг) - с учетом содержания активного компонента. Нетоксичная доза НЧ Fe_3O_4 была определена исходя из результатов предыдущих исследований [Farsiyan et al., 2022]. Все растворы воздействующих агентов были введены после предварительного их проведения через антибактериальные мембранные фильтры (диаметр пор 0,45 мкм). По истечении времени воздействия, все животные были выведены из эксперимента под действием легкого эфирного наркоза. Для проведения дальнейших биохимических анализов был произведен забор крови из воротной вены в вакутайнеры с антикоагулянтом $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$. Для проведения гистологических исследований часть каждого из образцов печеночной ткани была фиксирована в 10% формалине, а другая часть помещена в 10мМ К/Р буфер (рН 7,2) при 4°C для исследования активности фермента пероксидазы.

Определение биохимических маркеров функционирования печени. Биохимический анализ содержания общего белка (ОБ), альбумина, общего холестерина (ОХ), ЛПВП, ЛПНП, активностей аланинаминотрансферазы (АЛТ; КФ 2.6.1.2), аспартатаминотрансферазы (АСТ; КФ 2.6.1.1), гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ; КФ 2.3.2.2) и щелочной фосфатазы (ЩФ; 3.1.3.1) в плазме крови проводили с помощью стандартных наборов реактивов BioSystems (Барселона, Испания) на спектрофотометре UV-Vis 18 (MRC, Израиль) согласно прилагающимся протоколам.

Определение пероксидазной активности печеночной ткани. Определение активности печеночной ПО (КФ 1.11.1.9) определяли детекцией накопления продукта окисления пирогаллола - пурпургаллина при 420 нм на спектрофотометре UV-VIS 18 (MRC, Израиль) [Arutyunyan et al., 2019]. Концентрация белка была определена в надосадке гомогената печеночной ткани по методу [Lowry, 1951].

Гистологический анализ печеночной ткани. Предварительно фиксированные в 10% формалине, а после обезвоженные и пропитанные парафином образцы печеночной ткани были разрезаны микротомом на срезы толщиной 5 мкм. Окраска срезов печеночной ткани проводилась гематоксилин-эозином по стандартной методике [Ishii et al., 2016]. Препараты анализировали с использованием световой микроскопии на микроскопе AmScore (Америка), микрофотографии были получены с помощью цифровой камеры AmScore MU500 5MP.

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ материала проводили на основе комплексного применения стандартных статистических методов: вычисления средних значений, стандартных отклонений, стандартных средних ошибок. Биологическая повторность опытов 4 – 6 кратная при проведении 2 – 3 серий опытов в каждом. В таблицах, на графиках и диаграммах приведены средние арифметические и их стандартные ошибки. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Достоверность различий и корреляционных связей считалась установленной при p (вероятность ошибки) $< 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общее содержание флавоноидов в растительных экстрактах. Количественный состав флавоноидов в экстрактах зависит от многих факторов, начиная от сезона сбора растения, климатических условий прорастания, части растения, из которого был получен экстракт, экстрагента и метода экстракции. Результаты определения количества ОСФ в водно-спиртовых экстрактах представлены в таблице 1. Анализ ОСФ показал, что в большинстве экстрактов данный показатель очень высок, а максимальное ОСФ наблюдается у 50% Эт *R.orientalis* (36,12±1,39 мкг/г), 25% Эт *R.orientalis* (35,7±0,90 мкг/г) и 50% Эт *O.araratum* (36,34±0,8 мкг/г), минимальное ОСФ наблюдается в водных экстрактах, что можно связать с гидрофобными свойствами большинства флавоноидов.

Таблица 1.

Общее содержание флавоноидов (мкг/г сухого веса) в экстрактах наземных частей растений

Растение	Экстрагент				
	PBS	25% Эт	50% Эт	70% Эт	96% Эт
<i>T. polium</i>	5,8±0,08	9,34±0,05	24,9±0,08	26,34±0,11	22,11±0,04
<i>O.araratum</i>	11,17±0,05	18,43±0,04	36,34±0,80	13,99±0,04	2,45±0,04
<i>L.nobilis</i>	2,94±0,34	5,04±0,13	8,32±0,19	8,15±0,40	8,21±0,15
<i>H.perforatum</i>	1,78±0,09	11,23±0,09	21,76±0,17	21,43±0,50	14,92±0,04
<i>R.orientalis</i>	8,35±0,05	35,7±0,90	36,12±1,39	34,5±0,60	13,77±0,27
<i>A.millefolium</i>	10,33±0,24	15,34±0,20	21,19±0,28	22,05±0,29	18,36±0,80
<i>P.vulgaris</i>	12,68±0,32	24,75±0,9	16,37±0,01	12,28±0,04	13,13±0,01

$p < 0,05$

С другой стороны, можно утверждать, что наиболее активными экстрагентами являются 50% и 70% этанол, т.к. в большинстве случаев в линейке экстрактов одного растения именно в 50% или 70% этанольных экстрактах наблюдается наибольшее ОСФ. В связи с большим разбросом значений ОСФ было решено провести выборку экстрактов и принять в качестве критерия выборки минимальное значение ОСФ равное 16,42 мкг/г (среднее значение ОСФ среди всех экстрактов). В результате выборки для дальнейших исследований остались нижеперечисленные экстракты, расположенные по убыванию значения ОСФ: 50% Эт *O.araratum* > 50% Эт *R.orientalis* > 25% Эт *R.orientalis* > 70% Эт *R.orientalis* > 70%

Эт *T. polium* > 50% Эт *T. polium* > 25% Эт *P. vulgaris* > 96% Эт *T. polium* > 70% Эт *A. millefolium* > 50% Эт *H. perforatum* > 70% Эт *H. perforatum* > 50% Эт *A. millefolium* > 25% Эт *O. araratum* > 96% Эт *A. millefolium*.

Антирадикальная активность растительных экстрактов. Следует отметить, что радикал нейтрализующая активность всех исследованных экстрактов проявила дозозависимый характер. Все экстракты, кроме 25% этанольного экстракта *P. vulgaris* проявили высокую АРА. Было выявлено, что 50% этанольный экстракт *O. araratum* обладает как наибольшим ОСФ (36,34±0,8 мкг/г), так и наименьшей IC₅₀ (0,26±0,04 мг/мл), далее по показателю АРА наиболее активными были 70% и 50% Эт *H. perforatum*, значения ОСФ которых были близки друг другу. Значения IC₅₀ остальных экстрактов (за исключением 25% Эт *P. vulgaris*), независимо от ОСФ в них, были очень близки и лежали в диапазоне от 1 до 2,8 мг/мл.

ВЭЖХ анализ некоторых флавоноидов в исследуемых растительных экстрактах. Для понимания вклада в общую АРА отдельных флавоноидов, был проведен ВЭЖХ анализ всех экстрактов. 25% Эт *P. vulgaris* был исключен из данного списка, т.к. его значение IC₅₀ намного превышало таковое для всех остальных исследованных экстрактов. Данные содержания некоторых флавоноидов в исследуемых экстрактах приведены в таблице 2. Несмотря на наиболее высокие значения ОСФ и IC₅₀у 50% Эт *O. araratum* и 25% Эт *O. araratum*, а также 50% Эт *R. orientalis*, 25% Эт *R. orientalis* и 50% Эт *A. millefolium* не содержали детектируемых нами флавоноидов.

Таблица 2.

ВЭЖХ анализ содержания флавоноидов в экстрактах.

Экстракт	Кверцетин, мкг/мл	Рутин, мкг/мл	Гинестеин, мкг/мл	Апигенин, мкг/мл
96% Эт <i>T. polium</i>	-	2,100	0,150	-
70% Эт <i>T. polium</i>	-	3,740	0,210	-
70% Эт <i>H. perforatum</i>	0,018	0,600	-	0,40
70% Эт <i>R. orientalis</i>	-	7,400	-	-
70% Эт <i>A. millefolium</i>	0,038	2,240	1,080	-
96% Эт <i>A. millefolium</i>	0,025	0,760	1,120	-

- флавоноид не был детектирован, p<0,05

Как видно из Табл. 2 во остальных экстрактах было обнаружено рутинозид-гликозилированное производное кверцетина - рутин, который в большинстве случаев являлся мажорным флавоноидом среди детектированных. При этом по содержанию рутина экстракты можно расположить в следующем ряду по убыванию: 70% Эт *R. orientalis* > 70% Эт *T. polium* > 70% Эт *A. millefolium* > 96% Эт *T. polium* > 96% Эт *A. millefolium* > 70% Эт *H. perforatum*.

За исключением 70% Эт *H. perforatum* во всех остальных образцах содержание рутина коррелирует с АРА данных экстрактов. Данное явление предположительно коррелирует с тем фактом, что в *H. perforatum* мажорным компонентом является гиперин и его производные, вносящие существенный вклад в проявляемые экстрактом активности, в том числе АРА [Vardapetyan et al., 2012b]. При этом имеется корреляция между содержанием рутина и значениями IC₅₀ в экстрактах 70% Эт *R. orientalis*, 70% Эт *T. polium*, 70% Эт *A. millefolium*, 96% Эт *T. polium* и 96% Эт *A. millefolium*.

Антибактериальная активность экстрактов и наночастиц. Следует отметить, что 70% Эт *H. perforatum* не был исследован на проявляемую АБА, т.к. в данном экстракте содержалось значительное количество гиперина, препятствовавшего дальнейшему исследованию экстракта [Vardapetyan et al., 2006]. Так же на проявляемую АБА не был исследован 96% Эт *A. millefolium*, т.к. мажорным флавоноидом в его составе был не рутин, а гинестеин. Было выявлено, что НЧ Fe₃O₄ не обладали антибактериальными свойствами и не изменяли АБА экстрактов при совместном воздействии ни против *E. coli*, ни *S. aureus*, в то время как НЧ

Ag обладали выраженной АБА. НЧ Ag обладают АБА, которую можно сравнить с АБА ампицилина, но в концентрации в 4,76 раз превышающую концентрацию НЧ Ag. При этом ни ДСС, ни олеиновая кислота не обладали АБА в аналогичных концентрациях. Отдельно экстракты и раствор рутина обладали слабыми антибактериальными свойствами, а экстракты и вовсе не проявили АБА, однако при совместном применении экстрактов и НЧ Ag происходило потенцирование АБА, результаты исследования которой представлены на Рис. 1.

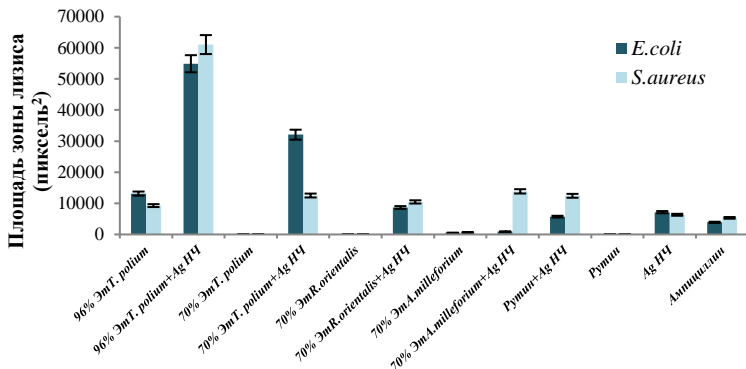


Рисунок 1. Площади зон лизиса при воздействии экстрактами, НЧ Ag, их композитов, рутина, ампицилина на *E. coli* и *S. aureus* (в пиксель², $p < 0,05$).

Против роста *E. coli* при совместном использовании с экстрактами НЧ Ag происходило увеличение АБА: в случае с 96% Эт *T. polium* в 4,2 раза, а в случае с экстрактами 70% Эт *T. polium* и 70% Эт *R. orientalis* использование НЧ привело к появлению выраженной АБА, отсутствовавшей у экстрактов. Против грам-положительного *S. aureus* экстракты 70% Эт *T. polium* и 70% Эт *R. orientalis* также не проявили активность, однако при совместном использовании с НЧ Ag, как и в случае с *E. coli*, появилась выраженная АБА, которая увеличилась от 1,7 до 2,5 раз. Наиболее активным опять был экстракт 96% Эт *T. polium*, который вместе с НЧ Ag проявляет в 6,6 раз большую АБА. Хотя значения АБА после стандартизации по рутину между разными экстрактами разнятся, похожие данные наблюдаются и в случаях воздействия НЧ Ag вместе с рутином, откуда можно сделать вывод, что усиление АБА НЧ Ag обусловлено содержанием в экстрактах флавоноидов, в том числе и рутина, что соответствует литературным данным [Adamczak et al., 2020], а разница между проявленными АБА скорее всего связана с разницей в содержании других активных веществ в исследуемых экстрактах.

Резистентность эритроцитов. Наиболее удобной моделью для выявления проявляемых цитотоксических свойств является РВС-тест, позволяющий напрямую оценить степень гематотоксичности исследуемых образцов [Kirakosyan et al., 2000]. В случае НЧ Ag при 2-10 кратных разбавлениях происходил тотальный гемолиз сразу после их добавления к суспензии эритроцитов. Аналогичная картина наблюдалась при добавлении к суспензии стабилизатора НЧ - ДСС (0,21 мг/мл), таким образом, можно утверждать, что гемолитическая активность НЧ Ag обусловлена присутствием токсичного стабилизатора, что препятствует дальнейшему использованию НЧ Ag. При этом ни НЧ Fe₃O₄, ни олеиновая кислота не проявили цитотоксичности по отношению к эритроцитам.

96% Эт *T. polium* и 70% Эт *T. polium* по прошествии 60 мин не приводили к гемолизу, однако по прошествии 24 ч инкубации наблюдался незначительный гемолиз, а

резистентность эритроцитов при этом составила 73% и 78% соответственно. При инкубации с 70% Эт *R.orientalis* гемолиз начинался с 27 мин, а к 60 мин наблюдался полный гемолиз, в случае с 70% Эт *A.milleforium* гемолиз начинался уже с 5 мин, а к 95 мин наблюдался полный гемолиз. Совместное воздействие НЧ Ag с экстрактами приводило к полному гемолизу, что обусловлено токсичностью НЧ Ag, а НЧ Fe₃O₄ не повлияли на проявленные гемолитические свойства экстрактов. Учитывая проявленные гематотоксические свойства, было определено, что наиболее биосовместимыми агентами были экстракт 70% Эт *T. polium* и НЧ Fe₃O₄, с которыми и были проведены дальнейшие эксперименты.

Оценка воздействия рутина, 70% этанольного экстракта *T. polium*, НЧ Fe₃O₄ и их комплексов на функциональные характеристики печени животных. К веществам, действие которых непосредственно направлено на печеночную ткань, предъявляются определенные требования [Bjornsson et al., 2016], соответствие которым проверяется скринингом в крови основным биохимическим маркерам функционирования печени. Согласно статьям многих авторов [Van de Walle et al., 2019; Eftekhari et al., 2021; Zamaу et al., 2017] печень является одним из главных органов накопления НЧ. Таким образом, необходимым является факт идентификации профиля воздействия рутина, 70% Эт *T. polium*, НЧ Fe₃O₄ и их комплексов как на печень с патологическим процессом, также и на здоровую печеночную ткань.

Оценка повреждения печени при воздействии рутина, 70% этанольного экстракта *T. polium*, НЧ Fe₃O₄ и их комплексов. Прямым биохимическим маркером повреждения печеночной ткани является АЛТ, активность которой в норме у контрольных животных доходит до 10,6±0,7 Ед/л. При совместном воздействии 70% Эт *T. polium* и НЧ Fe₃O₄, а также рутина и НЧ Fe₃O₄ имеется гепатотоксическое воздействие, однако данные значения активности фермента в 3,6 и 2,28 раз меньше, чем при воздействии СС14 в группе ЖДП-контроль (76,6±2,31 Ед/л). Во всех остальных группах активность фермента остается в пределах нормальных значений.

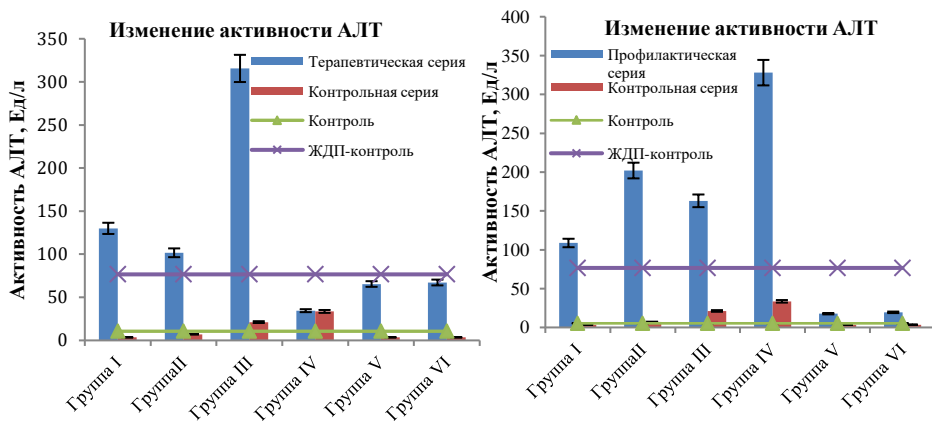


Рисунок 2. Активность АЛТ (Ед/л) в плазме крови экспериментальных животных терапевтической (слева) и профилактической (справа) серий экспериментов ($p < 0,05$).

С другой стороны, оценку функционирования печени необходимо проводить на основании комплексного подхода, учитывая данные показателей активности в первую очередь и АСТ. В контрольной группе животных активность АСТ доходит до 5,3±0,3 Ед/л, повышение же активности АСТ наблюдается при и/п введении 70% Эт *T. polium* в 8,01 раз,

70% Эт *T. polium* с НЧ Fe_3O_4 в 7,34 раз, НЧ Fe_3O_4 в 2 раза и даже при введении лекарственного препарата карсил в 14,01 раз. Такие повышения активностей могут быть связаны с воздействием данных агентов в том числе и на митохондрии клеток других органов. На основании полученных данных можно утверждать, что рутин, также как и рутин с НЧ Fe_3O_4 не обладают токсичностью при внутривенном введении.

Так же можно утверждать, что во всех группах, за исключением IV и VI, имеется повышение активности ЩФ. Одновременное повышение активности и ГТТ (контроль $17,42 \pm 0,63$ Ед/л) указывает на локализацию патологического процесса в желчных протоках. На фоне нормальных значений активности ГТТ в группах III и V, наблюдается повышение активности ЩФ, что может косвенно указывать на наличие патологического процесса в других участках организма. Учитывая тот факт, что в группах III и V имело место комплексное введение НЧ Fe_3O_4 , и тот факт, что многими авторами сообщается о способности данных НЧ проникать в костную ткань, можно предположить, что повышение активности плазматической ЩФ осуществляется за счет костной изоформы данного фермента. Однако в группе IV, где воздействующими агентами были лишь НЧ Fe_3O_4 не наблюдается повышения ни ЩФ, ни ГТТ. А факт повышения активности ГТТ на фоне нормальных значений ЩФ в группе VI, может указывать на патологический процесс в поджелудочной железе. Таким образом, НЧ Fe_3O_4 не обладают выраженным токсическим действием на печень здоровых крыс Wistar, однако при совместном введении с 70% Эт *T. polium* и рутином, происходят изменения в проявляемой комплексами активности. При токсическом повреждении печени белых беспородных крыс Wistar и/п введением CCl_4 у животных наблюдалась типичная картина токсического повреждения печени. При этом имело место резкое увеличение показателей активности АЛТ ($103,7 \pm 3,1$ Ед/л), АСТ ($27,4 \pm 2,9$ Ед/л), ЩФ ($117,5 \pm 3,3$ Ед/л) и ГТТ ($23,81 \pm 1,4$ Ед/л) в группе ЖДП-контроль. В серии экспериментов по изучения терапевтического воздействия при оценке уровня активности АЛТ было выявлено, что активность фермента продолжала повышаться в группах воздействия 70% Эт *T. polium* и рутином (Рис.2).

При этом имело место резкое увеличение показателей активности АЛТ ($103,7 \pm 3,1$ Ед/л), АСТ ($27,4 \pm 2,9$ Ед/л), ЩФ ($117,5 \pm 3,3$ Ед/л) и ГТТ ($23,81 \pm 1,4$ Ед/л) в группе ЖДП-контроль. В серии экспериментов по изучения терапевтического воздействия при оценке уровня активности АЛТ было выявлено, что активность фермента продолжала повышаться в группах воздействия 70% Эт *T. polium* и рутином (Рис.2). Максимальное значение активности АЛТ было зафиксировано в группе комплексного воздействия 70% Эт *T. polium* с НЧ Fe_3O_4 , где активность фермента в 3 раза превышала активность АЛТ наблюдаемой в группе ЖДП-контроль. В остальных группах животных активность фермента оставалась повышенной, при этом воздействие комплексом рутина с НЧ Fe_3O_4 понижало активность АЛТ в 2 раза. Во всех группах без исключения наблюдается стойкое повышение активности АСТ как относительно контрольной группы ($5,3 \pm 0,3$ Ед/л), так и ЖДП-контроля ($27,4 \pm 2,9$ Ед/л). Максимальное повышение активность при этом наблюдается при и/п введении комплекса 70% Эт *T. polium* с НЧ Fe_3O_4 , минимальное - НЧ Fe_3O_4 . Повышение активностей ЩФ и ГТТ так же наблюдается во всех группах, за исключением IV, где имеется понижение активности ЩФ до контрольных значений ($6,91 \pm 0,28$ Ед/л). Несмотря на это, повышенная активность ГТТ в группе IV ($25,00 \pm 1,23$ Ед/л), указывает на патологические явления в поджелудочной железе.

Примечательно, что по отдельности 70% Эт *T. polium* и НЧ Fe_3O_4 приводят к значительному повышению активности ЩФ, что может указывать на явления холестаза, однако комплексное введение 70% Эт *T. polium* с НЧ Fe_3O_4 приводит к понижению активности фермента почти в 2 раза. А комплексное введение рутина с НЧ Fe_3O_4 понижают активность

ЩФ как относительно группы ЖДП-контроль, так и относительно групп с воздействием рутина и НЧ Fe_3O_4 в отдельности в данной серии экспериментов. Во всех группах за исключением V и VI наблюдается повышение активности ГГТ. И хотя сами НЧ Fe_3O_4 не приводят к повышению активности ГГТ, они способны повышать данный эффект при комплексном введении с 70% Эт *T. polium* и рутином.

Оценка воздействия рутина, 70% этанольного экстракта *T. polium*, НЧ Fe_3O_4 и их комплексов на липидный обмен. В норме в плазме крови самцов белых беспородных крыс Wistar контрольной группы уровень общего холестерина доходит до $2,87 \pm 0,16$ мМ/л, ЛПВП- $0,8 \pm 0,09$ мМ/л и выше, ЛПНП - до $2,07 \pm 0,22$ мМ/л. По данным показателям в контрольной серии экспериментов только в группе I содержание общего холестерина близко к нормальным значениям. В остальных группах наблюдается понижение содержания общего холестерина, с максимальным снижением в группе IV. Несмотря на это, в некоторых группах наблюдается повышение содержания ЛПВП (группы II, III и VI), в остальных же случаях имеется понижение содержания ЛПВП (группы I, IV и V) с минимальными, почти идентичными значениями в группах IV и V. По уровню же содержания ЛПНП во всех экспериментальных группах данной серии экспериментов наблюдается гиполипемический эффект, с минимальным содержанием в группе III. Таким образом, 70% Эт *T. polium*, рутин с НЧ Fe_3O_4 и НЧ Fe_3O_4 приводят к понижению всех фракций ЛП, а рутин, 70% Эт *T. polium* с НЧ Fe_3O_4 и карсил повышают содержание ЛПВП и понижают содержание ЛПНП. Во всех сериях экспериментов во всех группах сохранялся гиполипемический эффект. Примечательно, что при воздействии НЧ Fe_3O_4 в серии терапевтического воздействия содержания общего холестерина в плазме крови крыс близко к контрольным значениям, а при определении фракций ЛП выявляется уменьшение фракции ЛПНП и повышение фракции ЛПВН. Во всех остальных группах за исключением VI-й содержания ЛПНП и ЛПВН также были близки друг к другу. В группе VI наблюдалось резкое понижение содержания ЛПНП как относительно контроля (в 6,9 раз), так и ЖДП-контроля (в 8,2 раза).

Fe_3O_4 НЧ в профилактической серии приводили к максимальному снижению показателя общего холестерина в 3 раза ниже контроля и почти в 4 раза ниже наблюдаемых в группе ЖДП-контроль. При этом в данной группе наблюдается значительное понижение содержания ЛПНП. При введении 70% Эт *T. polium* и рутина определяются близкие значения содержания общего холестерина, однако рутин, сохраняя ЛПВП на близком к нормальным уровням, приводит к значительным понижениям ЛПНП (в 3,6 раз), а 70% Эт *T. polium* понижает содержание всех фракций ЛП. При совместном введении Fe_3O_4 НЧ с 70% Эт *T. polium* сохраняется общий профиль воздействия экстракта, а при совместном воздействии с рутином профили воздействия различаются. Так, несмотря на липемический эффект, критически снижается содержание ЛПВП, в то время как ЛПНП повышаются до максимальных детектируемых в данной серии экспериментов значений. Следует отметить, что в группе ЖДП-контроль гиперлипемический эффект достигается за счет повышения обеих фракций ЛП (ЛПВП - $1,19 \pm 0,012$ мМ/л, ЛПНП - $2,46 \pm 0,03$ мМ/л). Т.о. можно утверждать, что все вводимые компоненты препятствовали гиперлипемическим проявлениям СС1а.

Оценка воздействия рутина, 70% этанольного экстракта *T. polium*, НЧ Fe_3O_4 и их комплексов на синтетическую функцию печени. В плазме крови контрольных животных уровень альбумина составляет $29,33 \pm 1,3$ г/л, общего белка - $45,23 \pm 1,43$ г/л. В контрольной серии экспериментов по данному показателю в группах III, IV, V и VI наблюдается гиперальбуминемия. На этом фоне почти во всех группах, кроме II-й и V-й, также отмечается повышение содержания общего белка. Повышения на фоне почти нормальных

содержаний альбумина характерны при патологических состояниях, когда общая белковая фракция повышается за счет белков острой фазы, также повышения в содержании общего белка могут быть также обусловлены за счет выхода в общий кровоток и ферментов АЛТ, АСТ, ЩФ, ГГТ. Общая тенденция содержания общего белка и альбумина в плазме крови экспериментальных животных сохранилась и в терапевтической серии экспериментов: максимальное повышение альбумина наблюдается при воздействии комплексом рутин с НЧ Fe_3O_4 , а максимальное содержание общего белка – рутином и рутином с НЧ Fe_3O_4 . Однако, следует отметить, что в группе ЖДП-контроль повышение содержания общего белка достигало $59,85 \pm 2,17$ г/л, а содержание альбумина $24,63 \pm 0,59$ г/л. В серии экспериментов изучения профилактического действия лишь в группе III наблюдается гиперальбуминемия. В остальных группах воздействия содержание альбумина находилось в рамках допустимой нормы. Во всех группах воздействия без исключения была выявлена гиперпротеинемия, максимально выраженная в группе I. Примечательно, что в группах воздействия 70% Эт *T. polium* во всех сериях экспериментов (контрольная, экспериментальная и профилактическая) содержание альбумина сохранялось примерно на одинаковом уровне.

Оценка активности печеночной пероксидазы при воздействии рутин, 70% этанольного экстракта *T. polium*, НЧ Fe_3O_4 и их комплексов. В контрольной серии экспериментов наибольшая активность ПО была детектирована в гомогенатах печени крыс группы V, где активность фермента составляла 15052 ± 364 лкат/мг белка. Активность фермента в данной группе в 1,98 раз превышала активность ПО в группе контрольных животных (7624 ± 281 лкат/мг белка). Во всех остальных группах активность ПО была ниже контрольных значений. Так в группе II, данное значение составляло 4581 ± 172 лкат/мг белка и было в 1,66 раз меньше. При совместном воздействии компонентов этих групп, т.е. рутин с НЧ Fe_3O_4 (группа IV), ПО активность в гомогенатах печени практически отсутствовала. Аналогичная картина наблюдалась в группе I, где была детектирована фоновая активность ПО (896 ± 93 лкат/мг белка), а в группе VI активность ПО в гомогенатах практически отсутствовала.

В терапевтической серии экспериментов, где активность печеночной ПО имела фоновые значения в группе ЖДП-контроль. Наибольшая активность ПО была детектирована в группе V (4558 ± 290 лкат/мг белка), чуть меньшие значения были определены в гомогенатах печени животных группы I (3934 ± 207 лкат/мг белка). Практически идентичные друг другу значения были получены в группах II и IV (2496 ± 82 лкат/мг белка и 2724 ± 64 лкат/мг белка соответственно). В группе III максимальная ПО активность составила 1171 ± 37 лкат/мг белка, а в группе VI - 1374 ± 45 лкат/мг белка. В данной серии экспериментов в группах I, III, IV и VI активность печеночной ПО была выше, нежели в гомогенатах печени аналогичных групп контрольной серии экспериментов.

В профилактической серии экспериментов максимальная активность фермента была выявлена в группе I (8544 ± 137 лкат/мг белка). Активность печеночной ПО также была высока в группе VI (6224 ± 245 лкат/мг белка). Несмотря на то, что рутин является мажорным компонентом флавоноидного ряда, детектированным в экстракте 70% Эт *T. polium*, активность фермента в группе II была в 3,6 раз меньше активности ПО группы I, т.е. воздействие экстракта на ферментативную активность печеночной ПО обусловлено также и другими компонентами экстракта. При этом их совместное с НЧ Fe_3O_4 воздействие в данной серии экспериментов привело к понижению активности печеночной ПО в 4,5 раз в группе III, и практически полному нивелированию в группе IV. Сами НЧ Fe_3O_4 в группе V приводят к критическому понижению активности печеночной ПО (764 ± 59 лкат/мг белка).

Т.о. наблюдается разнопрофильность воздействия исследуемых агентов на ПО активность здоровой и патологической печеночной ткани. При этом даже в рамках одной серии экспериментов не совпадали профили воздействия 70% Эт *t. polium* и детектированного в нем рутина, что свидетельствует о вкладе в суммарный эффект также и иных компонентов экстракта.

Гистологический анализ морфологических изменений печеночной ткани при воздействии рутина, 70% этанольного экстракта *T. polium*, НЧ Fe_3O_4 и их комплексов.

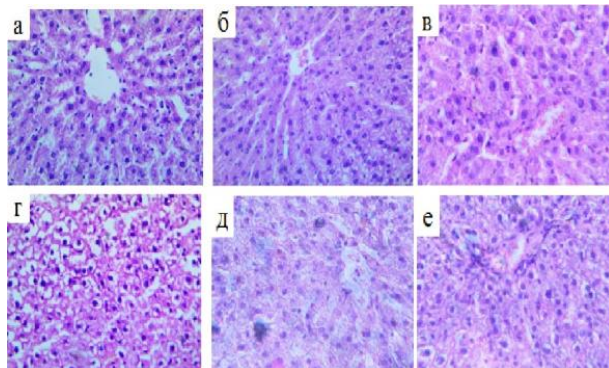


Рисунок 3.
Микрофотография (окуляр 20X, объектив 100X) препаратов печеночной ткани животной серии экспериментов при воздействии: а – 70% Эт *t. polium*, б – рутина, в – 70% Эт *t. polium* с НЧ Fe_3O_4 , г – рутина с НЧ Fe_3O_4 , д – НЧ Fe_3O_4 , е – карсила.

При разработке модели токсического повреждения печени по типу развития цирроза была выбрана модель токсического повреждения путём введения CCl_4 . При этом животных выводили из эксперимента на стадии ЖДП. При гистологическом исследовании препаратов печеночной ткани повсеместно были выявлены участки центрлобулярного некроза с выраженной диффузной дистрофией гепатоцитов со смещением ядер на периферию, а также участки диапедезных кровоизлияний, что указывает на процесс начального этапа развития цирроза печени [Tian et al., 2022].

В контрольной группе животных контрольной серии экспериментов, наблюдалась характерная для печеночной ткани архитектоника без отклонений от нормы (Рис. 3). В серии экспериментов по исследованию токсического действия воздействующих агентов во всех группах воздействия наблюдалась характерная для печени архитектоника, с сохранением дольчатой структуры и радиальным расположением гепатоцитов, а также нормальной наполненностью кровеносных сосудов. Однако в группах II и V в отдельных гепатоцитах наблюдаются слабо выраженные дистрофические изменения: мутность цитоплазмы и наличие оптически различных вакуолей, а группе IV данные дистрофические изменения наблюдаются в большинстве гепатоцитов. При этом во всех группах наблюдается частичная наполненность сосудов кровью.

В терапевтической серии экспериментов (Рис.4) в группе I, IV и V наблюдается характерная печени архитектоника, с сохранением дольчатой структуры и радиальным расположением гепатоцитов, кровеносные сосуды в основном полнокровны, а в гепатоцитах не наблюдается дистрофических или некротических изменений. В группах II, III и VI сохранена дольчатая структура печени и радиальное расположение гепатоцитов, однако в отдельных полях зрения гепатоциты подвержены дистрофическим изменениям: мутная цитоплазма и оптически пустые вакуоли. Также наблюдается частичная наполненность сосудов кровью.

На фоне выраженных изменений, наблюдаемых в печеночной ткани животных в группах I, II, III и VI профилактической серии экспериментов, в группе IV сохранена характерная печени дольчатая структура и радиальное расположение гепатоцитов (Рис. 5).

В группе V гистологический анализ печенной ткани выявил частичное сохранение характерной архитектоники, с сохранением гепатоцитов в центральных частях долек и жировой дистрофией на периферии, а в отдельных дольках периферические гепатоциты подверглись некротическим изменениям.

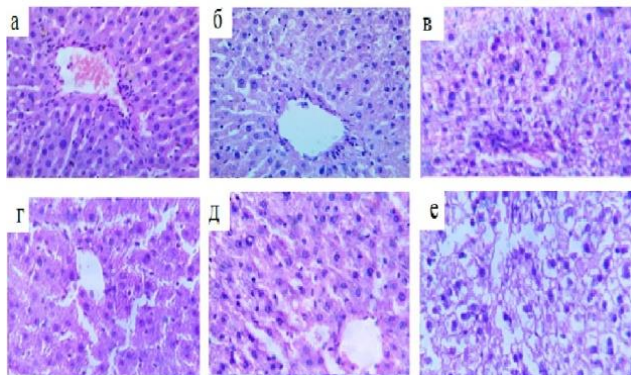


Рисунок 4.
Микрофотография (окуляр 20X, объектив 100X) препаратов печенной ткани животных терапевтической серии экспериментов при воздействии: а – 70% Эт *T. polium*, б – рутина, в – 70% Эт *T. polium* с НЧ Fe₃O₄, г – рутина НЧ Fe₃O₄, д – НЧ Fe₃O₄, е – карсила.

Таким образом, из вышеизложенного следует, что при и/п введении здоровым крысам 70% Эт *T. polium* (группа I), 70% Эт *T. polium* с НЧ Fe₃O₄ (группа III) и карсила (группа VI) не происходит морфологических изменений в печенной ткани, в то время как введение рутина (группа II), рутина с НЧ Fe₃O₄ (группа IV) и НЧ Fe₃O₄ (группа V) вызывают токсические изменения в структуре гепатоцитов. Данные изменения наиболее выражены в группе IV, что может быть следствием кумулятивного токсического воздействия составных компонентов комплекса.

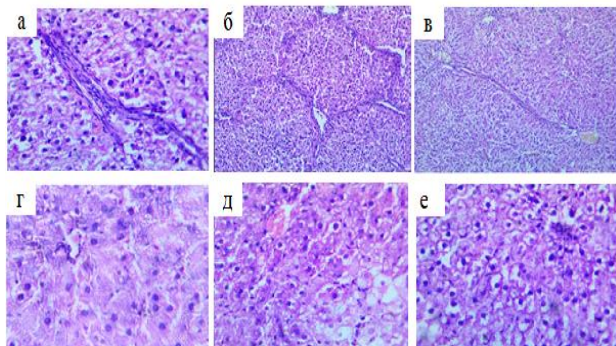


Рисунок 5.
Микрофотография (окуляр 20X, объектив 100X) препаратов печенной ткани животных профилактической серии экспериментов при воздействии: а – 70% Эт *T. polium*, б – рутина, в – 70% Эт *T. polium* с НЧ Fe₃O₄, г – рутина с НЧ Fe₃O₄, д – НЧ Fe₃O₄, е – карсила.

Однако, учитывая продолжительность (2 месяца) и частоту воздействия (на каждый 4 день), можно считать, что данные компоненты не обладают выраженной токсичностью, а проявляемые эффекты могут быть невилированы за счет уменьшения дозы воздействия. А если учесть, что в серии терапевтического воздействия в группах I, IV и V происходит восстановление характерной для печенной ткани структуры без наблюдаемых патологических морфологических изменений, то следует, что НЧ Fe₃O₄ способен не только подавить развитие ЖДП, но и привести к восстановлению структуры гепатоцитов.

ВЫВОДЫ

1. 70% этанол является наиболее эффективным экстрагентом для выхода рутина из растительного сырья, содержание рутина в 70% этанольных экстрактах коррелирует с их антирадикальной активностью.
2. 70% этанольный экстракт *T. polium* и НЧ Fe₃O₄ при исследованных концентрациях не проявляют цитотоксичность ни относительно эритроцитов человека, ни относительно бактерий *E.coli* K12 и *S.aureus* MDC 5233.
3. НЧ Fe₃O₄ способны повышать активность печеночной ПО в контрольной серии экспериментов почти в 2 раза.
4. НЧ Fe₃O₄ проявляют большую гепатопротекторную активность, чем препарат карсил в аналогичной концентрации в профилактической серии экспериментов, а в терапевтической серии приводят к нормализации биохимических показателей функционирования печени.
5. Все воздействующие агенты во всех сериях экспериментов приводят к нарушению липидного обмена и активации синтетической функции печени.
6. Биосовместимые НЧ Fe₃O₄ сферической формы диаметром от 4 до 24 нм в дозировке 40 мг/кг, могут быть рекомендованы для дальнейшего изучения и разработки дозирок и схем воздействия в качестве потенциальных профилактических и терапевтических агентов при ЖДП/ ЦП.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. **Казарян Ш.А.**, «Антирадикальные свойства и действие на эритроциты человека экстрактов *Ocimum sanctum* и *Ocimum araratum*», Вестник РАУ №2, 102-111, 2017.
2. Ohanyan A., Shishkoyan N., **Kazaryan Sh.**, Hovhannisyan A., Tiratsuyan S., Elbekyan K., Koshel V., Khodzhayan A., “Antioxidant and hemolytic properties of different extracts from *Prunella vulgaris* L. leaves”, Medical News of North Caucasus 13(3), 2018 DOI: [10.14300/mnnc.2018.13091](https://doi.org/10.14300/mnnc.2018.13091)
3. Khachatryan A., **Kazaryan Sh.**, Tiratsuyan S., Hovhannisyan A., "Antibacterial effect of silver and iron oxide nanoparticles combined with antibiotics on *E. coli* K12“, Microbiology and Biotechnology, 9:587-596, 2019, DOI [10.1007/s12668-019-00640-0](https://doi.org/10.1007/s12668-019-00640-0)
4. **Kazaryan S.**, Petrosyan M., Rshtuni L., Dabaghyan V., Hovhannisyan A. “Effects of Green Silver Nanoparticles on CCl₄ Injured Albino Rats’ Liver”. 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME 2019. IFMBE Proceedings, vol 77. 127-131, 2020. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-31866-6_27
5. **Kazaryan Sh.**, Rshtuni L., Hovhannisyan A., “The Synergistic Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles and *T. polium* Extracts” Biophysics, 66(4), 623-628, 2021 doi [10.1134/S000635092](https://doi.org/10.1134/S000635092)
6. Gevorgyan V., Vardapetyan H., **Kazaryan Sh.**, Elbekyan K., «Study of antibacterial activity of iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles», Материалы VI международной научной интернет конференции, Физико-химическая биология, стр.12-15, 2018.
7. **Kazaryan Sh.**, Tumoyan J., Hovhannisyan A., “Effects of Fe₃O₄ Nanoparticles on Outbred Wistar Rats Liver Function”, Book of abstracts of V International Conference of Biotechnology and Health, Yerevan, Armenia, 29-31 October 2020, pp. 86-89.
8. **Казарян Ш.А.**, Оганесян А.А., «Оценка воздействия Fe₃O₄ НЧ на CCl₄ поврежденную печень белых беспородных крыс Wistar», материалы конференции «Ломоносов 2021», 2021.

ՂԱԶԱՐՅԱՆ ՇՈՒՇԱՆԻԿ ԱՐՄԵՆԻ

ԴԵՂԱԲՈՒՅՄԵՐԻ ԼՈՒԾԱՄԶՎԱԾՔՆԵՐԻ ԵՎ ՄԵՏԱՂՆԵՐԻ ՆԱՆՈՄԱՆԻԿՆԵՐԻ
ՀԱՄԱՏԵՂ ԱԶԴԵՅՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԼՅԱՐԴԻ ՑԻՌՈՋԻ
ԶԱՐԳԱՅՄԱՆ ԿԱՆԽԱՐԳԵԼՄԱՆ ԵՎ ԲՈՒԺՄԱՆ ՀԱՄԱՐ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Բանալի բառեր՝ լյարդի ցիռոզ, *T.polium*-ի լուծամզվածք, ռուտին, Fe_3O_4 -ի նանոմասնիկներ, դեղամիջոցների համալիրներ, հեպատապաշտպանիչ

Աշխատունակ տարիքի մարդկանց մոտ լյարդի ցիռոզի (ԼՑ) տարածվածության աճը հանդիսանում է համաշխարհային առողջապահական հիմնահարցերից մեկը: ԼՑ կանխարգելման ու բուժական ռազմավարությունների մշակման գործընթացում անհրաժեշտ է ցուցաբերել նոր մոտեցումներ, ստեղծել բազմամոդալ, համակցված ազդեցության դեղամիջոցներ: Վերջիններս պետք է բավարարեն մի շարք պահանջների՝ ունենան բարձր կենսամատչելիություն, կենսահամատեղելիություն, թիրախավորված ազդեցություն, բուժական բարձր արդյունավետություն ու ցածր չափաբաժիններ, կողմնակի նվազ ազդեցություններ: Այդ և շատ այլ հատկություններ համակարգում են բնական ծագման միացությունները, նանոմասնիկները (ՆՄ), դրանց համալիրները դեղամիջոցների հետ: Հետազոտությունների նպատակն է եղել բացահայտել մի շարք դեղաբույսերի տարբեր լուծամզվածքների և նրանց բաղադրիչների, ինչպես և Fe_3O_4 -ի ՆՄ-ի, դրանց համատեղ ազդեցությունը ԼՑ/ճարպային դիստրոֆիայի զարգացման կանխարգելման և բուժման գործընթացում:

Աշխատանքում ուսումնասիրվել է 35 տարբեր բույսերի ֆենոլային, ֆլավոնոիդային շարքի երկրորդային մետաբոլիթների ընդհանուր բաղադրությունը, դրանց լուծամզվածքների հակառադիկալային (ՀՌԱ), հակաբակտերիալ (ՀԲԱ), հեմոլիտիկ ակտիվությունները: Պարզվել է, որ ըստ ՀՌԱ-ի ամենակտիվ էքստրազենտը հանդիսանում է 70% սպիրտը, իսկ բոլոր լուծամզվածքների ՀՌԱ-ն ցուցաբերում է դոզա կախյալ բնույթ: ԲԱՀՔ վերլուծության արդյունքում բացահայտվել է, որ *T. polium*-ի 96% սպիտային, *R. orientalis*, *T. polium*, *A. millefolium*, *H. perforatum* բույսերի 70% բուֆերա-էթանոլային լուծամզվածքներում ֆլավոնոիդների շարքում ռուտինը հանդիսացել է մաժորային բաղադրիչ: Fe_3O_4 -ի նանոմասնիկները (ՆՄ) (1,0 մգ/մլ) ՀԲԱ չեն ցուցաբերում ինչպես *E.coli*-ի, այնպես էլ *S.aureus*-ի նկատմամբ, անկախ լուծամզվածքների բնույթից: Ag ՆՄ-ը (0,21 մգ/մլ) ցուցաբերում են ամպիցիլինի (1 մգ/մլ), հակամանրէային ակտիվությունը 4,76 անգամ գերազանցող ակտիվություն, պոտենցում են նաև համապատասխան լուծամզվածքների ՀԲԱ-ն:

RBC թեստի վերլուծության արդյունքում բացահայտվել, որ առավել կենսահամատեղելի են Fe_3O_4 ՆՄ-ը, *T.polium*-ի 70% բուֆերա-էթանոլային լուծամզվածքը և նրանց կոմպոզիտը, որոնք գործնականում չեն ցուցաբերում բջջատոքսիկություն:

ԼՑ/ճարպային դիստրոֆիայով մոդելային կենդանիների բուժական շարքում Fe_3O_4 ՆՄ-ը (40 մգ/կգ, 4-24 ամ) բերում են ԱԼՏ-ի ակտիվության, քոլեստերինի, LDL, HDL-ի և սպիտակուցային նյութափոխանակության կարգավորմանը, ընդ որում

նրանց ցուցադրած կանխարգելիչ ազդեցությունը չի զիջում կարսիլի ազդեցությանը, որը հաստատվում է նաև հյուսվածքաբանական վերլուծությամբ: Հետազոտական կանխարգելման շարքում Fe_3O_4 ՆՄ-ը, ռուտինը և դրանց համալիրը նույնպես ցուցաբերում են հեպատոպաշտպան հատկություններ:

T. polium-ի 70% բուֆերա-էթանոլային լուծամզվածքի և Fe_3O_4 ՆՄ-ի համալիրը մասամբ հեպատոտոքսիկ է, ինչը դրսևորվում է ստուգիչ փորձերի շարքում արյան մեջ լյարդի հյուսվածքի վնասման ցուցանիշների (ԱՄՏ, ԱՍՏ) ակտիվության բարձրացումով: Բուժիչ փորձերի շարքում կոմպոզիտի հեպատոտոքսիկությունը դառնում է ավելի ցայտուն (ԱՄՏ-ի ակտիվությունն աճում է գրեթե 4 անգամ, իսկ ԱՍՏ-ինը՝ 7,4 անգամ):

Համադրելով կենսաքիմիական և հյուսվածքաբանական հետազոտությունների արդյունքները կարելի է եզրակացնել, որ *T. polium*-ի 70% բուֆերա-էթանոլային լուծամզվածքը և նրա զուգակցումը Fe_3O_4 ՆՄ-ի հետ Լ3/ճարպային դիստրոֆիայով մոդելային համակարգի վրա կանխարգելիչ ազդեցություն չեն ցուցաբերում, սակայն դրանց չափաբաժինների փոփոխությունների արդյունքում հետագա աշխատանքների ընթացքում կարելի է ստանալ ՆՄ-ի հետ համակցված կանխարգելիչ համալիրներ: Փորձերի կանխարգելիչ շարքում (CCl₄-ի հետ *T. polium*-ի 70% բուֆերա-էթանոլային լուծամզվածքի, Fe_3O_4 ՆՄ-ի ու *T. polium*-ի 70% բուֆերա-էթանոլային լուծամզվածքի, ռուտինի և կարսիլի միաժամանակյա ընդունմամբ) ազդող գործոնների և համալիրների հակառակակալային պոտենցիալները կարող են բավարար չլինել թթվածնի ակտիվ ձևերի և մակաձված այլ ազատ ռադիկալների մեծ քանակությունը չեզոքացնելու համար, ինչը, ի վերջո, հանգեցնում է լյարդի ցիռոզի մոդելի լիարժեք ձևավորմանը: Այնուամենայնիվ, ռուտինի և Fe_3O_4 ՆՄ-ի համալիրը, Fe_3O_4 ՆՄ-ը կարող են ճնշել այդ գործընթացները, որն էլ հանգեցնում է Լ3-ի լիարժեք ձևավորման գործընթացի խաթարմանը:

Հետազոտությունների փորձարարական բոլոր շարքերից ստացված արդյունքների բազմակողմանիությունը բացատրվում է Fe_3O_4 ՆՄ-ի բարձր կենսահասանելիությամբ, որը բերում է համալիրների չափաբաժինների նվազեցման, բուժական ազդեցության արդյունավետության մեծացման:

Գնդաձև, 4-24 նմ տրամագծով, 40 մգ/կգ դեղաչափով Fe_3O_4 ՆՄ-ով պայմանավորված ստացված փորձարարական արդյունքները լյարդի հյուսվածքի վնասման կենսաքիմիական, հյուսվածքաբանական ցուցանիշների կարգավորման գործընթացներում թույլ են տալիս հետագա ուսումնասիրությունների համար դրանց առաջադրել որպես Լ3-ի կանխարգելիչ և բուժական պոտենցիալ միջոցներ, նոր տիպի դեղամիջոցների համալիրների ստացման համար:

INVESTIGATION OF THE JOINT EFFECT OF MEDICAL PLANT EXTRACTS AND METALL NANOPARTICLES FOR THE TREATMENT AND PREVENTION OF LIVER CIRRHOSIS DEVELOPMENT

SUMMARY

Keywords: liver cirrhosis, *T. polium* extract, rutin, Fe₃O₄ nanoparticles, drug complexes, hepatoprotector

The increasing prevalence of liver cirrhosis (LC) in people of working age is one of the global health problems. In the process of LC prevention and treatment development, it is necessary to provide new approaches, create multimodal drugs with combined effect. The latter must satisfy a number of requirements: to have high bioavailability, biocompatibility, high therapeutic efficiency, low dose and minimal side effects. These and many other properties are coordinated by compounds of natural origin, nanoparticles (NPs) and their complexes with drugs. The aim of the research was to identify the different extracts of a number of herbs, their components, Fe₃O₄ NPs and their combined effect in prevention and treatment of LC/fatty liver.

To identify the most biocompatible samples TFC, ARA, composition of secondary metabolites of the flavonoid series, ABA and hemolytic properties of 35 different buffer-ethanol extracts of *R. orientalis*, *O. araratum*, *P. vulgaris*, *A. millefolium*, *T. polium*, *H. perforatum* and *L. nobilis* were investigated. It was found that the most active extractant is 70% ethanol, and the ARA of all extracts shows a dose-dependent character. As a result of the HPLC analysis, it was revealed that rutin was the major flavonoid in 96% *T. polium ethanol extract*, 70% buffer-ethanol extracts of *R. orientalis*, *T. polium*, *A. millefolium*, *H. perforatum*. Fe₃O₄ NPs (1.0 mg/ml) showed no ABA against *E. coli* and *S. aureus*. Ag NPs (0.21 mg/ml) showed 4.76 times more ABA than ampicillin (1 mg/ml) and potentiated the ABA of the respective extracts.

As a result of RBC-test analysis, it was revealed that Fe₃O₄ NPs, *T. polium* 70% buffer-ethanol extract and their composite are the most biocompatible, and they practically don't show cytotoxicity.

Fe₃O₄ NPs (40 mg/kg, 4-24 nm) lead to the regulation of ALT activity, cholesterol, LDL, HDL and protein metabolism in the therapeutic series of experiments. At the same time, the preventive impact on them isn't inferior to the influence of carsil, which is also confirmed by a histological analysis. Fe₃O₄ NPs, rutin and their complex also shows hepatoprotective properties in the preventive series of experiments.

T. polium 70% ethanol-buffer extract with Fe₃O₄ NPs is partially hepatotoxic, which is manifested by an increase in the activity of direct markers of liver damage (ALT, AST) in the blood in the control and therapeutic series of experiments, the hepatotoxicity of the composite becomes more pronounced (ALT activity increases almost 4 times, AST 7.4 times). Combining the results of biochemical and histological research it can be concluded that *T. polium* 70% ethanol-buffer extract and its combination with Fe₃O₄ NPs has no

preventive impact on the LC/fatty liver model also. On the other hand, in a prophylactic series of experiments with simultaneous administration with CCl_4 and with excessive formation of ROS, ARA of the acting agents may not be sufficient to suppress such a number of free radicals that are formed - initiators of LC/fatty liver development, which ultimately results in the formation of cirrhosis when exposed to *T. polium* 70% ethanol-buffer extract, *T. polium* 70% ethanol-buffer extract with Fe_3O_4 NPs, rutin, and carsil, however, Fe_3O_4 NPs and its complex with rutin can suppress these processes and formation of a LC.

However, we assume that changing the dose of influential agents in future experiments can lead to obtaining protective complexes with NPs. The diverse of the results among all series of experiments is explained by ability of Fe_3O_4 NPs to increase bioavailability and, as a result, to lower the therapeutic dose of the components associated with it.

The resulting exposure to spherical Fe_3O_4 NPs on biochemical indicators of liver damage and histological data allow to recommend them for further research as potential agents for the treatment and prevention of LC and developing a new type of drugs complexes.



K. Shyryyev