

# ГЕПАТОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ТРАВЫ ЦИКОРИЯ ОБЫКНОВЕННОГО (*CICHORIUM INTYBUS L.*) В ОПЫТАХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

**И.А. Лупанова**

к.б.н., руководитель Центра доклинических исследований,  
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва, Россия)  
E-mail: lupanova@vilarnii.ru

**Актуальность.** Согласно рекомендациям экспертов ВОЗ, в лечении примерно 75% пациентов с заболеваниями органов пищеварения целесообразно применять препараты растительного происхождения. Интерес представляет лекарственное растительное сырье, содержащее в значительных количествах биологически активные вещества (БАВ) фенольной природы. К ним, в частности, относится цикорий обыкновенный (*Cichorium intybus L.*).

**Цель работы** – сравнительное изучение гепатопротекторной активности фракций БАВ различной полярности экстракта травы цикория обыкновенного с применением специфических ферментных биотест-систем *in vitro* на основе глутатионредуктазы и каталазы, цитохрома P450 и глутатионтрансферазы, а также подтверждение полученных данных в опытах *in vivo*.

**Материал и методы.** Объект исследования – фракции БАВ различной полярности экстракта травы цикория обыкновенного. Препарат сравнения – субстанция силимара. Исследования *in vitro* проводили с применением специфических ферментных биотест-систем, входящих в Биологическую коллекцию ФГБНУ ВИЛАР. Для подтверждения выявленных *in vitro* антиоксидантных свойств фракций травы цикория обыкновенного использовали модель экспериментального токсического гепатита у крыс введением тетрахлорметана. Фармакологические исследования проведены на белых нелинейных крысах. Патоморфологические исследования печени крыс выполняли с использованием гистологических методик. Функциональное состояние печени характеризовали по показателям активности аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, а также содержанию общего билирубина, глюкозы и холестерина в сыворотке крови крыс.

**Результаты.** В результате опытов *in vitro* с применением специфических ферментных биотест-систем показано, что образец водной фракции экстракта травы цикория обыкновенного проявлял наиболее выраженные антиоксидантные и антиоксидантные свойства, что позволило предположить наличие у БАВ данной фракции гепатопротекторной активности, которая было подтверждена результатами патогистологических и биохимических исследований на модели тетрахлорметанового гепатита у крыс.

**Выводы.** Выявлены антиоксидантные и антиоксидантные свойства фракций БАВ различной полярности экстракта травы цикория обыкновенного. В результате опытов *in vitro* установлено и подтверждено данными биохимических и патогистологических исследований, что наибольшей биологической активностью обладала водная фракция, доминирующими компонентами которой являются гидроксикоричные кислоты. Для оценки их вклада в механизм гепатопротекторного действия экстракта травы цикория обыкновенного требуются дополнительные исследования.

**Ключевые слова:** сухой экстракт травы цикория обыкновенного, *Cichorium intybus L.*, специфические ферментные биотест-системы *in vitro*, модель тетрахлорметанового гепатита.

**Для цитирования:** Лупанова И.А. Гепатопротекторная активность биологически активных веществ травы цикория обыкновенного (*Cichorium intybus L.*) в опытах *in vitro* и *in vivo*. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022;25(7):20–30. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-07-04>

Печень – один из самых крупных органов в организме человека, который выполняет множество взаимосвязанных жизненно важных функций. Существует целый ряд широко распространенных заболеваний печени, например, вирусный гепатит, алкогольная и неалкогольная жировая болезнь, аутоиммунное заболевание, повреждение печени, вызванное лекарственными препаратами, токсинами, и т.д. [1]. Хронические заболевания печени представляют собой серьезную проблему во всем мире, при этом цирроз печени является девятой по

значимости причиной смерти в западных странах [2]. Например, распространенность неалкогольной жировой болезни в Европе и США составляет 14–28%. Исследования в 2007 г. среди 30 754 поликлинических больных по распространенности этого заболевания в России показали, что оно выявлено у 27% пациентов, а в 2014 г. – у 37,1% [3].

Варианты лечения данных заболеваний часто ограничены по эффективности, сопряжены с риском побочных эффектов и являются слишком дорогостоящими, особенно для развивающихся стран.

Эффективность таких методов лечения, как применение интерферона, колхицина, пенициллина и кортикостероидов противоречива, а частота побочных эффектов высокая. Вследствие этого разработка эффективных лекарственных средств с низкой частотой побочных реакций крайне актуальна. В качестве таковых можно рассматривать лекарственные препараты растительного происхождения.

В последние годы появляется все больше работ, посвященных изучению влияния растений на функциональное состояние печени и их применению при различных заболеваниях органов гепатобилиарной системы, традиционно используемых в народной медицине [4–7].

Поэтому лечение заболеваний печени лекарственными препаратами растительного происхождения, при производстве которых не требуется сложных этапов синтеза, представляется весьма привлекательным [8]. Несмотря на достижения научной медицины в последние десятилетия, ученые уделяют все больше внимания фитотерапии [4]. Согласно рекомендациям экспертов Всемирной организации здравоохранения, в лечении примерно 75% пациентов с заболеваниями органов пищеварения целесообразно применять препараты растительного происхождения [9]. Такие препараты назначают как при терапии, так и при профилактике заболеваний, они безопасны, так как являются «природной» и, следовательно, безвредной альтернативой синтетическим препаратам. Важно отметить, что растительные экстракты представляют собой сложную смесь биологически активных веществ (БАВ), поэтому экспериментальные данные, полученные с индивидуальными веществами, не всегда согласуются с результатами для экстрактов или фракций [10]. Вместе с тем имеются сообщения о том, что при комбинированном применении двух или более БАВ растительного происхождения они проявляют большую активность, чем при применении отдельных соединений [11–13].

В настоящее время накоплено значительное количество экспериментальных данных, свидетельствующих о выраженной биологической активности соединений полифенольной природы. Эти вещества можно рассматривать как особый класс биологически активных соединений, для которых характерен широкий и разнообразный спектр влияния на функциональное состояние и структуру различных систем живого организма. Фенольные соединения проявляют противовоспа-

лительные [14], антиоксидантные [15], мембраностабилизирующие [16] свойства, что определяет механизм их гепатопротекторного действия на молекулярном уровне. В этом плане особый интерес представляют лекарственные средства из растительного сырья, содержащие в значительных количествах БАВ фенольной природы. К ним, в частности, относится цикорий обыкновенный (*Cichorium intybus* L.) [17]. Так, водные извлечения из наземной части *C. intybus* используют при заболеваниях печени в традиционной медицине Ирана, а семена растения используют при заболеваниях органов гепатобилиарной системы в Аюрведе [18].

На основании результатов проведенных фитохимических исследований и биологического скрининга в ФГБНУ ВИЛАР разработан способ получения субстанции, представляющей собой сухой экстракт травы цикория обыкновенного, в опытах *in vivo* подтверждена его гепатопротекторная активность [19, 20]. Для выявления возможных механизмов гепатопротекторного действия экстракта необходимо выявить целевую группу БАВ.

**Ц е л ь и с с л е д о в а н и я** – сравнительное изучение гепатопротекторной активности фракций БАВ различной полярности экстракта травы цикория обыкновенного с применением специфических ферментных биотест-систем (СФБТС) *in vitro* на основе ключевых ферментов антиоксидантной защиты глутатионредуктазы (ГР) и каталазы (КАТ), ферментов системы биотрансформации-детоксикации цитохрома P450 и глутатионтрансферазы (ГТФ), а также подтверждение полученных данных в опытах *in vivo*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве сырья использовали траву дикорастущего цикория обыкновенного, заготовленную в фазу цветения в Рыбновском районе Рязанской области в 2019 г.

Измельченное сырье экстрагировали (трехкратно) спиртом этиловым 70%-ным в соотношении 1:10 при температуре 60±5 °С. Объединенное извлечение концентрировали на ротормном испарителе до водного остатка и последовательно обрабатывали этилацетатом, затем н-бутанолом. Полученные извлечения концентрировали и высушивали до полного удаления растворителя, получая соответственно этилацетатную и бутанольную фракции. После этого водный остаток выливали в трехкратный объем спирта этилового 96%-ного и оставляли на 24 ч. Образовавшийся осадок отделяли фильтро-

ванием и высушивали (водная фракция). Надосадочный раствор концентрировали до сухого остатка и высушивали (спиртовая фракция).

Ранее проведенным исследованиями было установлено, что доминирующими компонентами

сухого экстракта травы цикория обыкновенного являются эскулетин и цикориин, а также цикориевая, хлорогеновая, кафтаровая кислоты. Содержание данных соединений определено и в исследуемых фракциях (рис. 1 и 2).

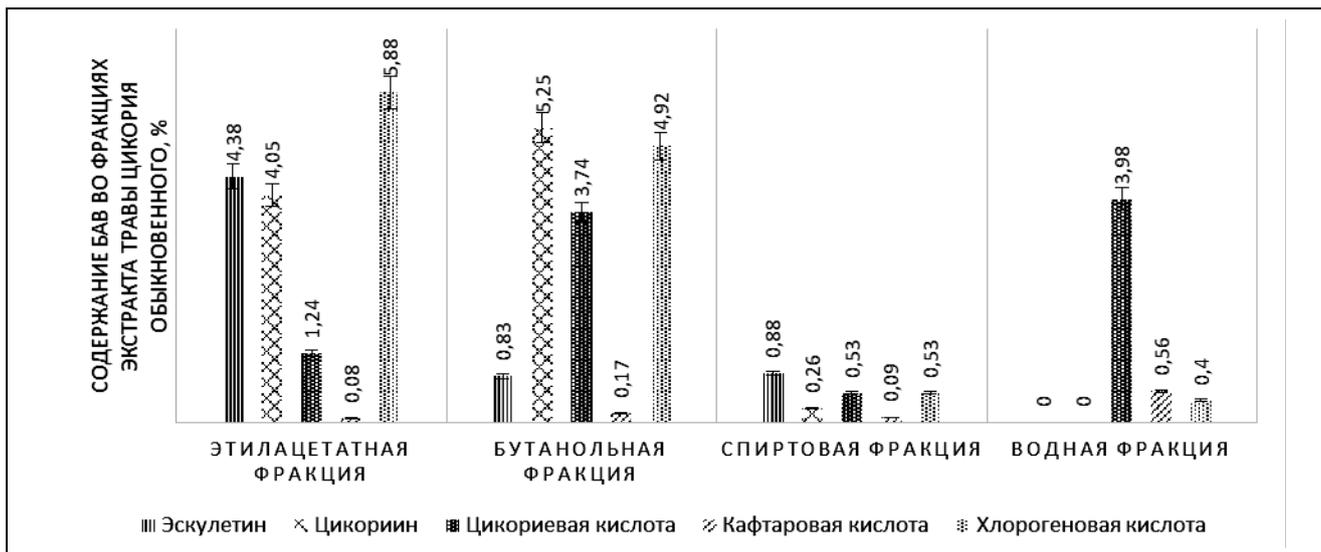


Рис. 1. Содержание доминирующих БАВ во фракциях экстракта травы цикория обыкновенного [20]

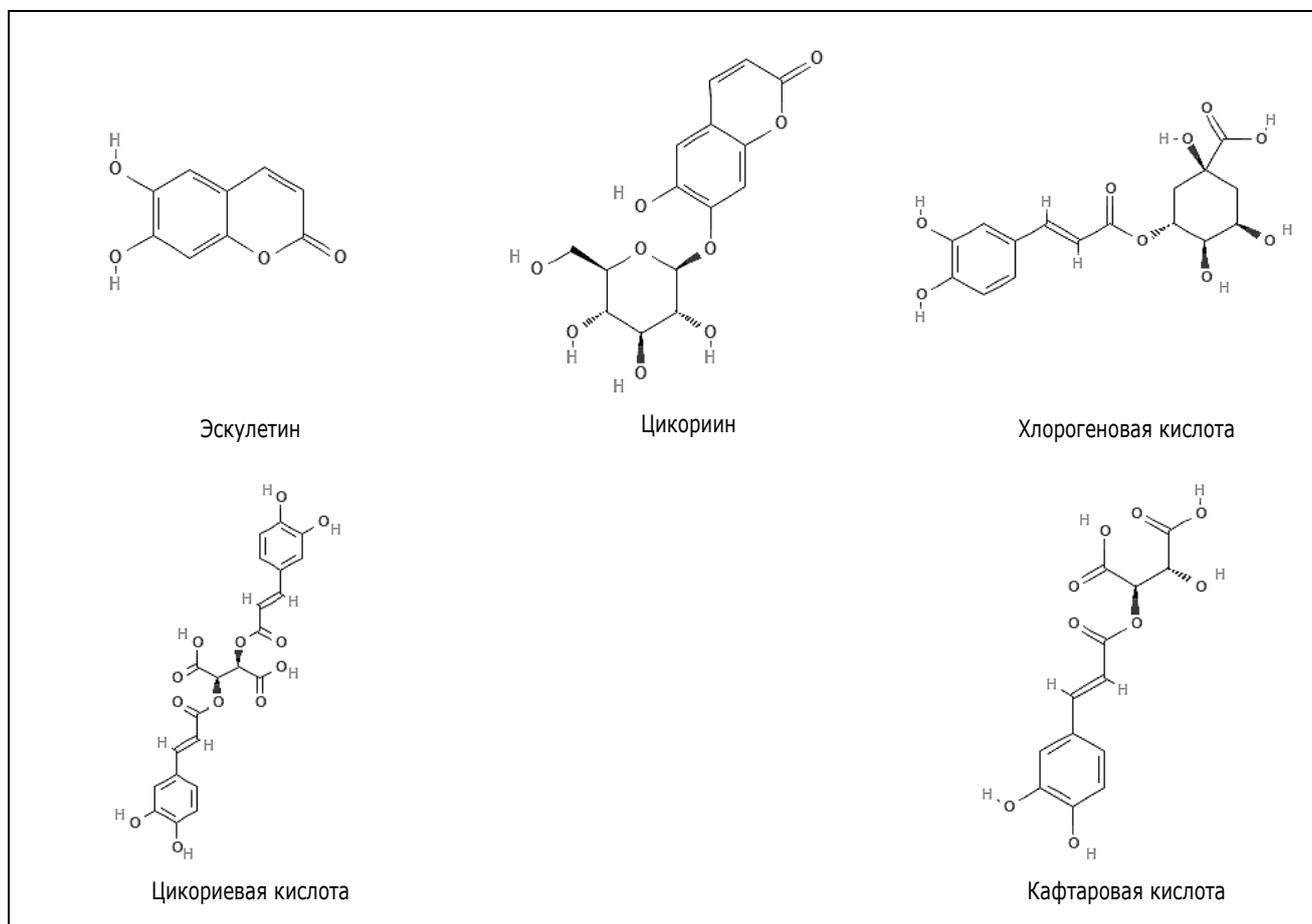


Рис. 2. Структуры доминирующих БАВ сухого экстракта травы цикория обыкновенного

В качестве препарата сравнения была выбрана субстанция силимара, обладающая гепатопротекторной активностью [21] и представляющая собой сухой очищенный экстракт, получаемый из плодов расторопши пятнистой – *Silybum marianum* (L.) Gaerth семейства Asteraceae.

В экспериментах использовали ферменты ГР, КАТ, НАДФН, окисленный глутатион, фосфаты натрия и калия, трис(гидроксиметил)аминометан и 2-водную динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты фирмы Merck Life Science (Германия). Буферные растворы готовили согласно ОФС.1.3.0003.15 «Буферные растворы». Измерение pH буферного раствора или доведение ее до заданного значения осуществляли с использованием pH-метр-милливольтметра фирмы Mettler-Toledo (Швейцария). Перекись водорода, фосфаты натрия и калия – ООО «АО РЕАХИМ» (Россия).

Скорость всех ферментативных реакций измеряли спектрофотометрически на анализаторе для клинической химии Clima MC-15 (Испания) и спектрофотометре MPS-2000 фирмы «Shimadzu» (Япония). Скорость глутатионредуктазной реакции определяли согласно [22] по снижению оптической плотности исследуемых растворов, за счет окисления НАДФН эквивалентным количеством восстановленного глутатиона. Для определения скорости каталазной реакции использовали метод, основанный на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс, то есть измерения вели по убыли перекиси водорода в процессе реакции [23]. Скорость конъюгации 2,4-динитрохлорбензола с восстановленным глутатионом в системе ГТФ определяли в 1-сантиметровой кювете при 27 °С по нарастанию поглощения при 340 нм вследствие образования продуктов конъюгации динитрохлорбензола и восстановленного глутатиона по методу W.H. Nabig [24]. Концентрация 2,4-динитрохлорбензола в пробе составляла 0,7 мМ, восстановленного глутатиона – 1 мМ. Скорость реакции п-гидроксилирования анилина и N-деметилирования диметиланилина, катализируемых цитохромом P450, определяли при 340 нм по убыли НАДФН при окислении в процессе реакции при 37 °С [25]. Концентрация НАДФН в пробе составляла 0,3 мМ, анилина и диметиланилина – 3 мМ, микросом – 1 мг/мл. Содержание цитохрома P450 в выделенных микросомах регистрировали спектрофотометрически [26]. Содержание общего белка определяли по методу Lowry [27]. В качестве источника

цитохрома P450 использовали микросомальную фракцию печени интактных белых нелинейных крыс массой тела 180–200 г, полученную методом дифференциального центрифугирования [28].

Сухие фракции и препарат сравнения добавляли в пробы после внесения ферментов в интервале концентраций 0,1–10,0 мкг/мл пробы. Установили, что зависимость эффекта фракций и препарата сравнения от концентрации описывается кривой с максимумом, и наиболее выраженный эффект по отношению к изучаемым ферментам наблюдался при концентрациях 3,3 мкг/мл в случае СФБТС на основе КАТ и ГР и 2 мкг/мл в случае СФБТС на основе цитохрома P450 и ГТФ. В связи с этим приводятся данные, полученные при выявленных оптимальных концентрациях объектов исследования.

С целью подтверждения выявленных *in vitro* антитоксических свойств фракций травы цикория обыкновенного использовали модель экспериментального токсического гепатита у крыс введением тетрахлорметана (CCl<sub>4</sub>) [29]. Фармакологические исследования выполняли в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [29]. Использование животных в эксперименте проводили в соответствии с рекомендациями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов в научных или иных целях (1986). Исследования одобрены биоэтической комиссией ФГБНУ ВИЛАР (протокол № 66 от 21.02.2022).

Животные содержались в виварии ФГБНУ ВИЛАР на стандартном рационе. Перед началом эксперимента животные находились на карантине 14 дней. В экспериментах было использовано 56 белых нелинейных крыс-самцов одного возраста с массой тела 200–250 г. Опытные животные были разделены на семь групп по 8 особей: первая группа – интактные (здоровые) крысы, которых использовали для определения исходного фона функционального состояния печени; вторая – контрольные животные, которым перед введением CCl<sub>4</sub> пять дней вводили эквивалентное количество очищенной воды в аналогичном с опытными группами режиме внутривентрикулярно; третья, четвертая, пятая и шестая группы (спиртовая, этанольная, бутанольная, водная) – опытные, которые перед введением CCl<sub>4</sub> получали исследуемые вещества фракции экстракта травы цикория обыкновенного пять дней в дозе 100 мг/кг; седьмая (си-

лимар) – животные, получавшие препарат сравнения субстанцию силимара в дозе 100 мг/кг, суспендированную в 1%-ном крахмальном геле в течение пяти дней.

Токсическое поражение печени вызывали однократным введением подкожно 50%-ного масляного раствора  $CCl_4$  (ООО «Компонент-Реактив», Россия) в дозе 0,4 мл на 100 г массы тела, через 1 ч после последнего введения исследуемых веществ. Через 48 ч после введения  $CCl_4$  брали кровь из хвостовой вены крыс. На восьмой день эксперимента крыс подвергали эвтаназии в  $CO_2$ -камере. Патоморфологические исследования печени крыс проводили с использованием гистологических методик. Гистологическое строение печени оценивали при окраске срезов печени гематоксилином и эозином. Биохимические исследования выполняли общепринятыми методами на биохимическом анализаторе CS-T240 («Dirui», Китай). Функциональное состояние печени характеризовали по показателям активности аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), а также содержанию общего билирубина, глюкозы и холестерина в сыворотке крови крыс.

Для оценки значимости различий выборок, имеющих нормальное распределение, применяли параметрический *t*-критерий Стьюдента, для ненормального распределения – *U*-критерий Манна–Уитни. Вычисляли среднее значение (*M*) и стандартную ошибку среднего (*m*). Различия между

сравнимыми значениями считали достоверными при уровне вероятности 95% и более ( $p < 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Окислительный стресс играет важную роль в патогенезе различных заболеваний [30]. Существуют данные, что использование синтетических антиоксидантов, предотвращающих повреждение свободными радикалами, может привести к токсическим побочным эффектам, поэтому все чаще в медицине используют антиоксиданты растительного происхождения [31], которые применяют для профилактики широкого спектра заболеваний, включая различные виды аллергии, сердечно-сосудистые заболевания, некоторые формы рака, заболевания печени и т.д., связанные с повреждениями, вызванными свободными радикалами [32–34].

В связи с этим на начальном этапе работы для изучения антиоксидантной активности БАВ, содержащихся в траве цикория обыкновенного, проводили биохимические эксперименты по определению непосредственного действия фракций БАВ различной полярности экстракта на ключевые ферменты антиоксидантной защиты – каталазу и глутатионредуктазу [35], которые являются одними из механизмов гепатопротекторного действия лекарственных средств.

На рис. 3 представлены статистически обработанные трехкратные повторности и выведенные средние значения активности КАТ и ГР.

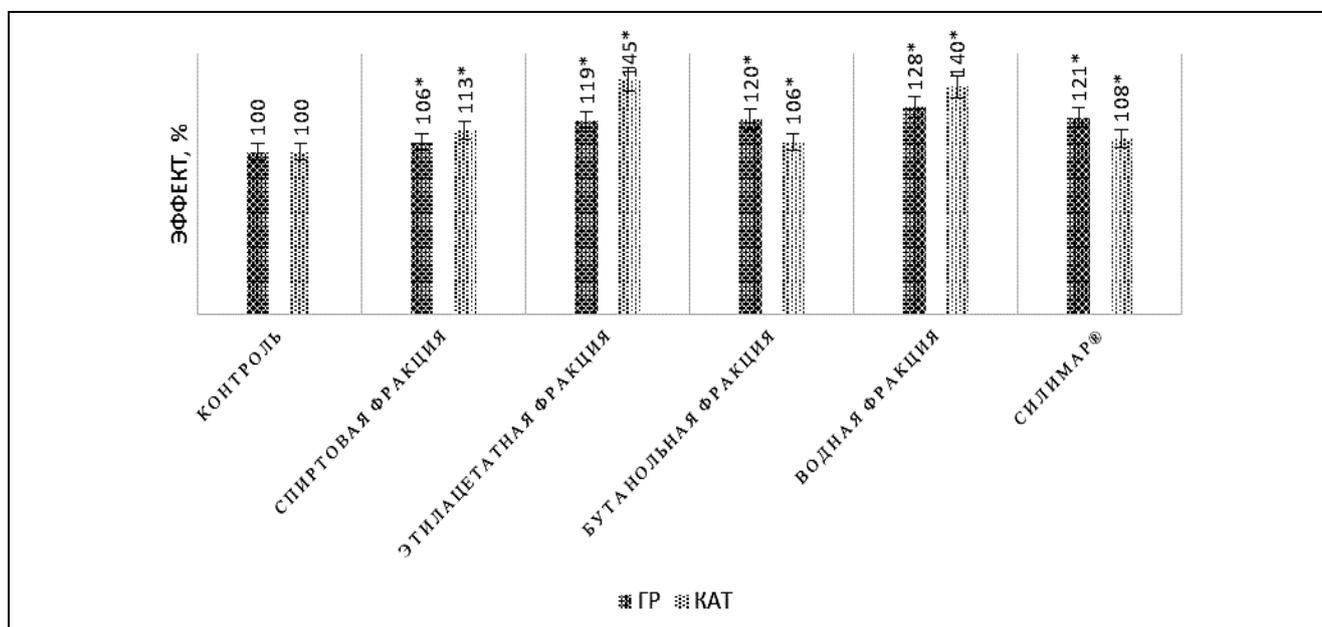


Рис. 3. Влияние фракций травы цикория обыкновенного на активность глутатионредуктазы и каталазы *in vitro* (\* – достоверность отличий от контроля при  $p < 0,05$ )

Из рис. 3 видно, что фракции цикория и препарат сравнения, субстанция силимара, оказывали непосредственное активирующее влияние на ГР и КАТ. Наиболее выраженный эффект проявляли этилацетатная и водная фракции. Так, в присутствии этилацетатной фракции скорость ГР-реакции увеличивалась на 19% по отношению к контролю, КАТ-реакции – на 45%. Внесение водной фракции в инкубационную среду приводило к активации ГР на 28%, КАТ – на 40%. Данные результаты показывают, что БАВ, содержащиеся во фракциях травы цикория обыкновенного, обладают свойствами лиганда глутатионредуктазы, ключевого фермента антиоксидантной защиты и каталазы, антиоксидантного фермента, и проявляют

таким образом, согласно [35], антиоксидантные свойства.

Полученные результаты согласуются с литературными данными и подтверждают антиоксидантный эффект травы цикория обыкновенного, особенно благодаря содержанию в ней цикориевой и хлорогеновой кислот [36–38].

Для выявления антиоксидантной активности БАВ травы цикория обыкновенного использовали комбинированную СФБТС на основе двух ключевых ферментов системы биотрансформации-детоксикации – цитохром Р450 и ГТФ. Результаты изучения влияния фракций на монооксигеназную активность цитохрома Р450 и ГТФ представлены на рис. 4.

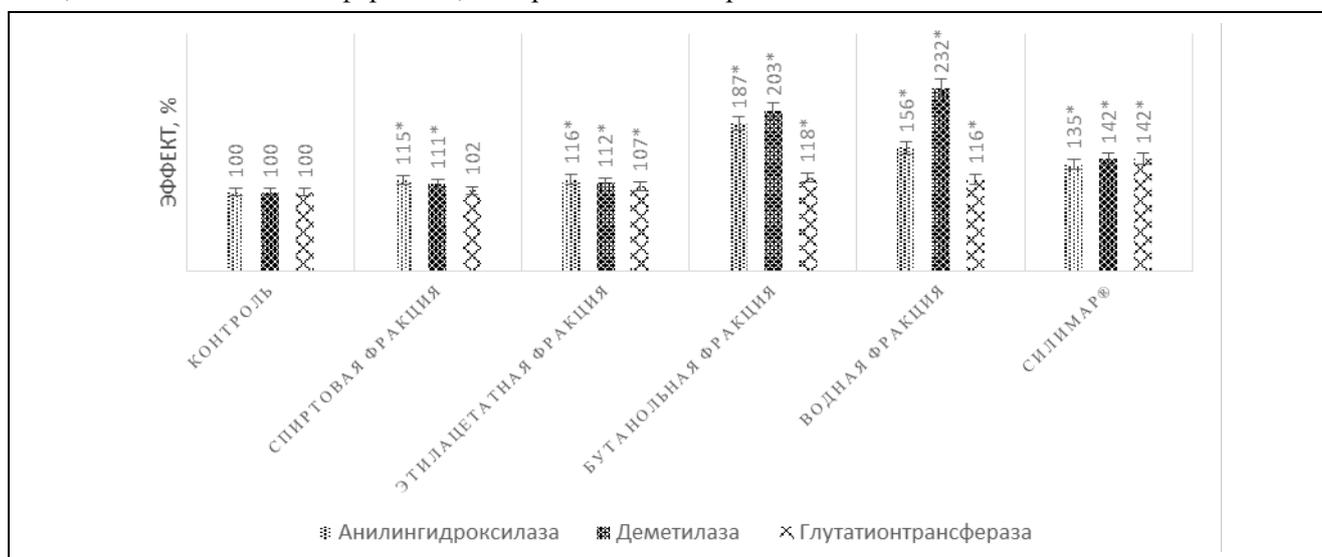


Рис. 4. Влияние фракций травы цикория обыкновенного на монооксигеназную активность цитохрома Р450 и ГТФ *in vitro* (\* – достоверность отличий от контроля при  $p < 0,05$ )

Из данных, представленных на рис. 4 следует, что все фракции оказывают непосредственное активирующее влияние на ферментативную активность цитохрома Р450 *in vitro*. При этом активирующее влияние на деметилазную активность (субстрат – диметиланилин) выше, чем на гидроксилазную (субстрат – анилин). Наиболее высокой активностью обладали водная и бутанольная фракции: в присутствии бутанольной фракции в концентрации 2 мкг/мл анилингидроксилазная активность цитохрома Р450 увеличивалась по сравнению с контролем на 87%, деметилазная – на 103%; в этих же условиях внесение водной фракции в пробу приводило к увеличению скорости анилингидроксилазной реакции на 56%, деметилазной – на 132% соответственно. Внесение препарата сравнения в инкубационную среду также

приводило к активации цитохрома Р450 и ГТФ. Силимар, в отличие от фракций, обладал более выраженным действием на ГТФ, которая катализирует второй этап биотрансформации, превращая органические альдегиды и перекиси липидов в нетоксичные продукты путем их конъюгации с глутатионом. Гидроксилазные и деметилазные реакции происходят в разных сайтах цитохрома Р450 [39], в связи с чем водная и бутанольная фракции цикория содержат БАВ, оказывающие непосредственное активирующее влияние на оба активных центра цитохрома Р450, что указывает на ускорение метаболизма широкого круга соединений, подвергающихся превращению с участием цитохрома Р450.

Данные фракции обладали также выраженным активирующим влиянием на ГТФ. В присут-

ствии водной фракции скорость ГТФ-реакции увеличивалась на 16% по отношению к контролю, бутанольной – на 18%. Таким образом, БАВ, содержащиеся в данных фракциях, непосредственно активировали цитохром Р450 и ГТФ, что свидетельствует об их антиоксидантных свойствах.

Результаты, полученные в опытах *in vitro*, были подтверждены биохимическими (таблица) и патогистологическими исследованиями печени крыс с токсическим поражением печени четыреххлористым углеродом (рис. 5–7).

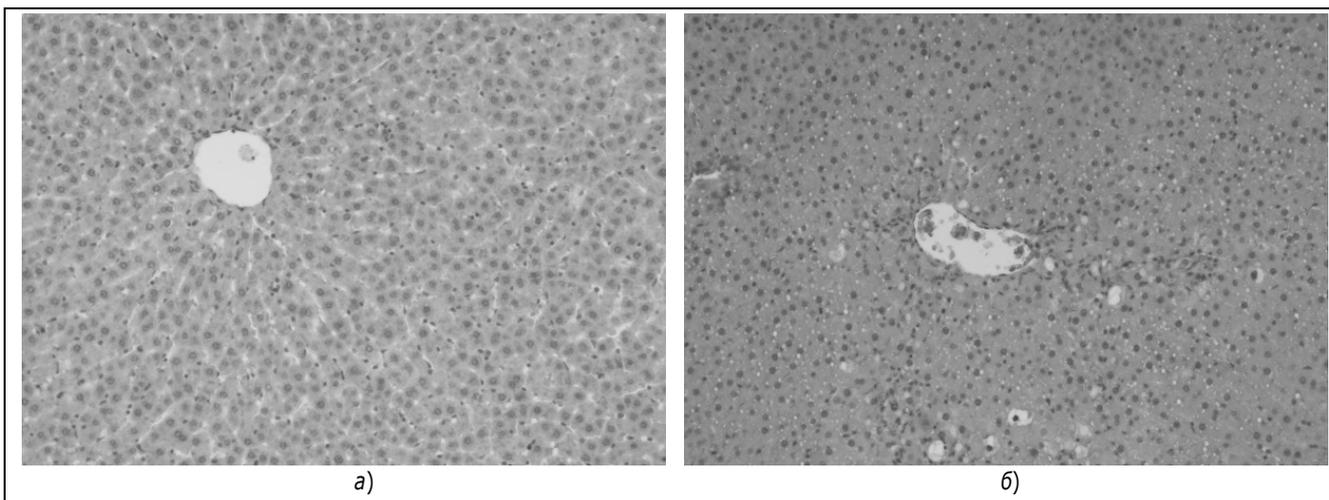
При моделировании токсического поражения печени с введением животным  $CCl_4$  наблюдались выраженные изменения активности ферментов-маркеров функционального состояния печени: увеличение активности АСТ в 1,5 раза, АЛТ – в 2

раза, ЩФ – в 1,4 раза. Из представленных результатов видно, что профилактическое 5-кратное введение в организм крыс с токсическим поражением печени фракций травы цикория обыкновенного вызывало снижение активности АСТ, АЛТ и ЩФ. Наибольшим угнетающим действием на активность ферментов-маркеров функционального состояния печени крыс обладали препарат сравнения силимар (АСТ – на 15%, АЛТ – на 33% и ЩФ – на 14%), водная (на 20,5, 40,9 и 11,8% соответственно) и бутанольная (на 18,2, 33,2 и 17,1% соответственно) фракции. Установленное влияние фракций на активность ферментов-маркеров функционального состояния печени крыс согласуется с полученными ранее результатами для суммарного экстракта травы цикория обыкновенного [20].

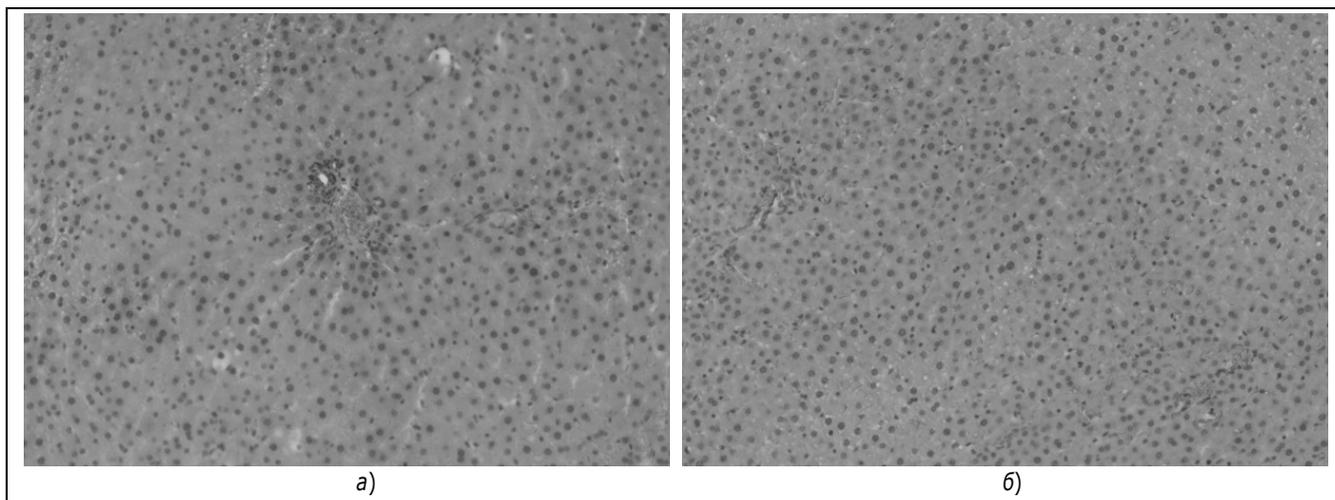
**Таблица. Результаты изучения влияния фракций травы цикория обыкновенного на активность ферментов-маркеров морфофункционального состояния гепатоцитов и содержание глюкозы и холестерина в сыворотке крови крыс с интоксикацией  $CCl_4$  ( $M \pm m$ )**

Группа крыс, $n=8$	АСТ, У/л	АЛТ, У/л	ЩФ, У/л	Билирубин общ., мкмоль/л
Интактные	96,8±6,5	55,9±5,0	393,2±3,5	2,4±0,26
Контрольные ( $CCl_4$ гепатит)	143,9±12,0 <sup>+</sup>	111,0±6,4 <sup>+</sup>	545,6±8,1 <sup>+</sup>	2,8±0,03 <sup>+</sup>
Спиртовая, 100 мг/кг	134,8±2,1*	84,2±2,9*	543,2±4,8*	2,46±0,08*
Этилацетатная, 100 мг/кг	129,2±3,1*	93,1±1,7*	484,0±6,9*	2,4±0,4*
Бутанольная, 100 мг/кг	117,8±2,4*	74,1±1,7*	452,0±6,8*	2,5±0,06*
Водная, 100 мг/кг	114,5±4,5*	65,6±3,1*	481,0±16,2*	2,4±0,03*
Силимар, 100 мг/кг	113,70±3,94*	65,56±1,23*	479,00±8,80*	2,34±0,08*

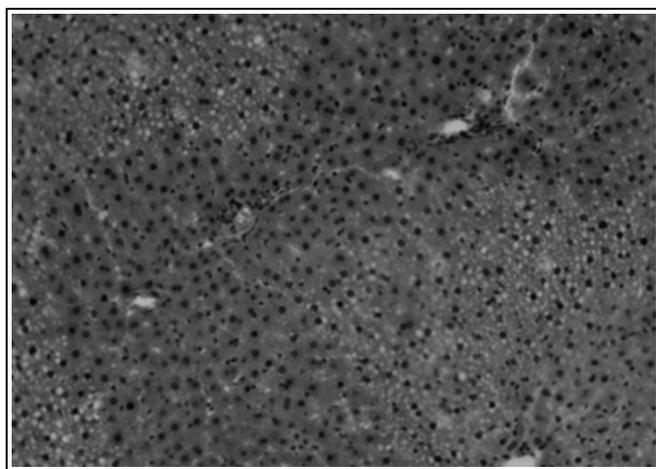
Примечание: <sup>+</sup> – статистическая значимость различий в сравнении с интактным контролем,  $p < 0,05$ , \* – относительно модели гепатита,  $p < 0,05$ .



**Рис. 5.** Морфологическое строение печени интактных крыс (а) и крыс с тетрахлорметановым гепатитом (б). Здесь и далее препараты окрашивали гематоксилином и эозином, увеличение  $\times 100$



**Рис. 6.** Морфологическое строение печени крыс, получавших водную (а) и бутанольную (б) фракции в дозах 100 мг/кг, модель тетрахлорметанового гепатита



**Рис. 7.** Морфологическое строение печени крыс, получавших субстанцию силимара в дозе 100 мг/кг, модель тетрахлорметанового гепатита

На следующем этапе работы проводили патогистологическое исследование печени крыс с токсическим поражением печени четыреххлористым углеродом. Морфологическое строение печени интактных крыс: прослеживается балочное строение. Дистрофических изменений не наблюдается (рис. 5,а). В печени крыс с острым токсическим поражением сулемой: отмечают дистрофические изменения по типу гиалиново-капельной дистрофии (рис. 5,б).

Дистрофические изменения гепатоцитов не выявлены после введения водной фракции в дозе 100 мг/кг, что свидетельствует о ее выраженных гепатопротекторных свойствах (рис. 6,а).

Морфологическое строение печени крыс с острым токсическим поражением тетрахлормета-

ном, получавших профилактически бутанольную фракцию в дозе 100 мг/кг, представлено на рис. 6,б.

В четырех случаях из пяти в гепатоцитах наблюдались изменения по типу гиалиново-капельной и жировой дистрофии, в связи с чем, оценивая морфологическую структуру органов крыс-самцов (рис. 6,б), можно сделать вывод, что бутанольная фракция в дозе 100 мг/кг обладала слабым гепатопротекторным действием на печень животных.

Оценивая морфологическую структуру печени крыс пятой группы, установили, что препарат сравнения субстанция силимара в дозе 100 мг/кг проявляет гепатопротекторную активность (рис. 7).

Полученные данные свидетельствуют о том, что по эффективности гепатопротекторного действия на указанной модели патологии печени водная фракция в дозе 100 мг/кг соответствует препарату сравнения силимар.

Из представленных результатов видно, что максимальным гепатопротекторным эффектом обладает водная фракция травы цикория обыкновенного в условиях модели тетрахлорметанового гепатита, которая содержит в преобладающем количестве цикориевую и хлорогеновую кислоты.

Полученные результаты по антиоксической и гепатопротекторной активности согласуются с литературными данными. Так, в работе S. Elgengailhi и соавт. (2016) показана гепатопротекторная активность экстрактов надземной и подземной частей цикория обыкновенного на модели тетрахлорметанового гепатита у крыс-самцов в дозе 500 мг/кг [18].

В. Ahmed и соавт. (2003) проводили скрининг антигепатотоксической активности на модели тет-

рахлорметанового гепатита у крыс различных фракций экстракта семян цикория обыкновенного и установили, что наибольшей активностью обладала метанольная фракция, в которой доминирующими компонентами являлись фенольные соединения [40].

В другом исследовании ученые выявили лечебный эффект хлорогеновой кислоты у крыс с прогрессирующим алкогольным стеатогепатитом (введением этанола (4 г/кг) в течение 8 недель и диетой с высоким содержанием жиров) за счет ее антиоксидантного и противовоспалительного действия [41].

## ВЫВОДЫ

С применением специфических ферментных биотест-систем *in vitro* на основе ключевых ферментов гомеостаза (каталаза, глутатионредуктаза, цитохром P450 и глутатионтрансфераза) изучены антиоксидантные и антитоксические свойства фракций БАВ различной полярности экстракта травы цикория обыкновенного. В результате опытов *in vitro* установлено и подтверждено данными биохимических и патогистологических исследований, что наибольшей биологической активностью обладает водная фракция, доминирующими компонентами которой являются гидроксикоричные кислоты. Для оценки их вклада в механизм гепатопротекторного действия экстракта травы цикория обыкновенного требуются дополнительные исследования.

Данная работа проведена согласно плану научно-исследовательской работы ФГБНУ ВИЛАР по теме: «Направленный скрининг, оценка фармакологической активности и безопасности биологически активных веществ и фармацевтических композиций на их основе» (FGUU-2022-0010).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Dhiman R.K., Chawla Y.K. Herbal medicines for liver diseases. *Digestive Diseases and Sciences*. 2005; 50(10): 1807–1812.
2. Stickel F., Schuppan D. Herbal medicine in the treatment of liver diseases. *Digestive Diseases and Sciences*. 2007; 39(4): 293–304.
3. Ивашкин В.Т., Барановский А.Ю., Райхельсон К.Л. и др. Лекарственные поражения печени (клинические рекомендации для врачей). *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2019; 29(1):85–115.
4. Levy C., Seeff L.D., Lindor K.D. Use of herbal supplements for chronic liver disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2004; 2(11):947–956.
5. Lam P., Cheung F., Tan H.Y. Hepatoprotective Effects of Chinese Medicinal Herbs: A Focus on Anti-Inflammatory and Anti-Oxidative Activities. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016; 17(4):465.
6. Rino Y., Yukawa N., Yamamoto N. Does herbal medicine reduce the risk of hepatocellular carcinoma? *World Journal of Gastroenterology*. 2015; 21(37):10598–10603.
7. Verma S., Thuluvath P.J. Complementary and alternative medicine in hepatology: review of the evidence of efficacy. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2007; 5(4):408–416.
8. Мизина П.Г. Растительные и минеральные биологически активные комплексы для медицинских технологий здравоохранения. М. Наука, 2021. 164 с.
9. Глобальная стратегия сектора здравоохранения по вирусному гепатиту 2016–2021. Всемирная организация здравоохранения. Женева, 2016. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.who.int/hepatitis/strategy2016-2021/ghss-hep/ru/>.
10. Liu Y., Flynn T.J., Ferguson M.S., Hoagland E.M. Use of the Combination. Index to determine interactions between plant-derived phenolic acids on hepatotoxicity endpoints in human and rat hepatoma cells. *Phytomedicine*. 2013; 20:461–468.
11. Karthikesan K., Pari, L., Menon V.P. Antihyperlipidemic effect of chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin in rats subjected to diabetogenic agents. *Chemico-Biological Interactions*. 2010; 188: 643–650.
12. Karthikesan K., Pari L., Menon V.P. Combined treatment of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid exerts potential anti-hyperglycemic effect on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *General Physiology and Biophysics*. 2010; 29: 23–30.
13. Prabhakar P.K., Doble M. Synergistic effect of phytochemicals in combination with hypoglycemic drugs on glucose uptake in myotubes. *Phytomedicine*. 2009;16: 1119–1126.
14. Yahfoufi N., Alsadi N., Jambi M. et al. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients*. 2018; 10(11):1618.
15. Fernandez-Panchon M.S, Villano D., Troncoso A.M. Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008; 48(7):649–671.
16. Righi N., Boumerfeg S., Deghima A. et al. Phenolic profile, safety assessment, and anti-inflammatory activity of *Salvia verbenaca* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 2021; 272: 113940.
17. Сайбель О.Л., Радимич А.И., Адамов Г.В. и др. Сравнительное фитохимическое изучение надземной части дикорастущего и культивируемого растения цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.). *Химия растительного сырья*. 2020; 3:187–195.
18. Elgengaihi S., Mossa A-T.H, Refaie A.A. Hepatoprotective Efficacy of *Cichorium intybus* L. Extract Against Carbon Tetrachloride-induced Liver Damage in Rats. *Journal of Dietary Supplements*. 2016; 13(5):570–584.
19. Сайбель О.Л., Радимич А.И., Даргаева Т.Д. и др. Патент RU 2771028. Способ получения средства, обладающего гепатопротекторным и антигепатотоксическим действием. Оpubл. 25.04.2022.
20. Сайбель О.Л., Радимич А.И., Даргаева Т.Д. и др. Фенольные соединения и гепатопротекторная активность экстракта травы цикория обыкновенного. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021; 10(4):36–45.
21. Вичканова С.А., Колхир В.К., Сокольская Т.А. и др. Лекарственные средства из растений (опыт ВИЛАР): научное издание. М. АДРИС. 2009. 432 с.
22. Beuter E. Red cell enzyme defects. *Hematologic Pathology*. 1990; 4(3): 103–114.
23. Королук М.А., Иванова М.И., Майорова И.Г. и др. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*. М.: Медицина. 1988; 1:1–8.

24. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*. 1974; 249(22):7130–7139.
25. Жуков А.А., Арчаков А.И. Стехиометрия реакций микросомального окисления. Распределение редокс-эквивалентов между монооксигеназными и оксидазными реакциями, катализируемыми цитохромом P-450. *Биохимия*. 1985; 50(12):1939–1952.
26. Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment. *Journal Biological Chemistry*. 1964; 7: 2370–2378. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)82245-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)82245-5).
27. Lowry O.H., Rosenberg N.Y., Farr A.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1): 265–275.
28. Карузина И.И., Бачманова Г.И., Менгазетдинов Д.Э., Мясоедова К.Н., Жихарева В.О., Кузнецова Г.И., Арчаков А.И. Выделение и свойства цитохрома P450 из микросом печени кроликов. *Биохимия*. 1979; 6: 1049–1057.
29. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
30. Gutteridge J.M., Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. NY Acad. Sci*. 2000; 899:136–147.
31. Conwell D.G., Jones K.H., Jiang Z., Lantry L.E., Keely P.S.W., Kohar I., Thornton D.E. Cytotoxicity of tocopherols and their quinines in drug-sensitive and multidrug-resistant leukemia cells. *Lipids*. 1998; 33:295–301.
32. Cook N.C., Samman S. Flavonoids chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem*. 1996; 7:66–76.
33. Middleton E.J., Kandaswami C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem Pharmacol*. 1992; 43:1167–1179.
34. Roger C.R. The nutritional incidence of flavonoids: some physiological and metabolic considerations. *Experientia* 1988; 44:725–733.
35. Быков В.А., Дубинская В.А., Минеева М.Ф. и др. Патент RU № 2181892. Способ выявления веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, *in vitro*. Опубл. 27.04.2002.
36. Pouille C.L., Ouaza S., Roels E. et al. Chicory: Understanding the Effects and Effectors of This Functional Food. *Nutrients*. 2022; 14(5):957.
37. Epure A., Pârnu A.E., Vlase L. et al. Phytochemical profile, antioxidant, cardioprotective and nephroprotective activity of romanian chicory extract. *Plants*. 2021; 10:64.
38. Jasim R.S. Antioxidant, antimicrobial activities and phytochemical constituents of *Cichorium intybus* L. Aerial Parts. *Int. J. Bot*. 2018; 14:24–29.
39. Лукашина Т.В., Минеева М.Ф., Дубинская В.А. и др. Использование специфических ферментных биотест-систем *in vitro* для разработки многокомпонентного препарата Стабином. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2007; 4: 25–30.
40. Ahmed B., Al-Howiriny T.A., Siddiqui A.B. Antihepatotoxic activity of seeds of *Cichorium intybus*. *J. Ethnopharmacol*. 2003; 87(2–3):237–240.
41. Buko V., Zavodnik I., Budryn G. et al. Chlorogenic Acid Protects against Advanced Alcoholic Steatohepatitis in Rats via Modulation of Redox Homeostasis, Inflammation, and Lipogenesis. *Nutrients*. 2021; 13(11):4155.

Поступила 30 мая 2022 г.

## STUDY OF *CICHORIUM INTYBUS* L. HERB EXTRACT HEPATOPROTECTIVE ACTIVITY *IN VITRO* AND *IN VIVO*

© I.A. Lupanova, 2022

I.A. Lupanova

Ph.D. (Biol.), All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow, Russia)

E-mail: lupanova@vilarnii.ru

**Relevance.** According to the World Health Organization recommendations it is advisable to use herbal medicines in the treatment of approximately 75% of patients with digestive system diseases. Medicinal plant raw materials contain significant amounts of biologically active substances (e.g. flavonoids, phenolic acids, etc.), that are of substantial interest. One of these biologically active substances sources is *Cichorium intybus* L. herb.

**The aim** of research is the hepatoprotective activity comparative study of the of biologically active substances fractions different polarity of the *Cichorium intybus* L. herb extract using specific enzyme biotest systems *in vitro* and confirmation attained results using *in vivo* models.

**Material and methods.** Common *Cichorium intybus* L. herb extract fractions have been under study in this research. The Silimar substance was chosen as the reference drug. Antioxidative and antitoxic activity was studied using specific enzyme biotest-systems *in vitro*. The identified *in vitro* protective effect was manifested through the activity of enzymes marking of the morphofunctional state of hepatocytes in rats and histopathological examination, against the background of toxic hepatitis induced by one-time tetrachloromethane injection.

**Results.** As a result of the research, it was shown that the aqueous fraction of the extract had the highest antioxidative and antitoxic activity *in vitro* using specific enzyme biotest-systems. Based on *in vitro* results it was provided the hepatoprotective activity of aqueous fraction. *In vitro* results were confirmed *in vivo*: prophylactic repeated administration of common chicory herb fractions into the body of rats with toxic liver damage caused a decrease in the activity of AST, ALT and AP. The greatest inhibitory effect on the activity of enzymes marking the functional state of rat livers had silymar (by 15%, ALT by 33% and AP by 14%,  $p < 0.05$ ) and aquatic (by 20.5%, 40.9% and 11.8%, respectively;  $p < 0.05$ ) fraction. The research design was approved by the Bioethical Commission of the FGBNU VILAR.

**Conclusion.** It was found the antioxidative and antitoxic activity BAS fractions of different polarity of the *Cichorium intybus* L. herb extract using specific enzyme biotest systems *in vitro* based on key homeostasis enzymes (catalase, glutathione reductase, cytochrome P450 and glutathione transferase). As a result of *in vitro* experiments, it was established and confirmed by the biochemical

and pathohistological studies that the aqueous fraction had the most obvious biological activity This fraction contains chicoric and chlorogenic acids; and these compounds can play dominant role in the hepatoprotective effect of the fraction.

**Key words:** carbon tetrachloride treatment model, *Cichorium intybus* L., chicory herb extract, fractions, hepatoprotective activity, specific enzyme biotest systems in vitro.

**For citation:** Lupanova I.A. Study of *Cichorium intybus* L. herb extract hepatoprotective activity *in vitro* and *in vivo*. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2022;25(7):20–30. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-07-04>

## REFERENCES

- Dhiman R.K., Chawla Y.K. Herbal medicines for liver diseases. Digestive Diseases and Sciences. 2005; 50(10): 1807–1812.
- Stickel F., Schuppan D. Herbal medicine in the treatment of liver diseases. Digestive Diseases and Sciences. 2007; 39(4): 293–304.
- Ivashkin V.T., Baranovskij A.Ju., Rajhel'son K.L. i dr. Lekarstvennye porazhenija pečeni (klinicheskie rekomendacii dlja vrachej). Rossijskij žurnal gastrojenterologii, gepatologii, koloproktologii. 2019; 29(1):85–115.
- Levy C., Seeff L.D., Lindor K.D. Use of herbal supplements for chronic liver disease. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 2004; 2(11):947–956.
- Lam P., Cheung F., Tan H.Y. Hepatoprotective Effects of Chinese Medicinal Herbs: A Focus on Anti-Inflammatory and Anti-Oxidative Activities. International Journal of Molecular Sciences. 2016; 17(4):465.
- Rino Y., Yukawa N., Yamamoto N. Does herbal medicine reduce the risk of hepatocellular carcinoma? World Journal of Gastroenterology. 2015; 21(37):10598–10603.
- Verma S., Thuluvath P.J. Complementary and alternative medicine in hepatology: review of the evidence of efficacy. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 2007; 5(4):408–416.
- Mizina P.G. Rastitel'nye i mineral'nye biologicheski aktivnye komplekсы dlja medicinskih tehnologij zdorov'esberezhenija. M. Nauka, 2021. 164 s.
- Global'naja strategija sektora zdavoohraneniya po virusnomu gepatitu 2016–2021. Vsemirnaja organizacija zdavoohraneniya. Zheneva, 2016. [Elektronnyj resurs]. URL: <http://www.who.int/hepatitis/strategy2016-2021/gss-hep/ru/>.
- Liu Y., Flynn T.J., Ferguson M.S., Hoagland E.M. Use of the Combination. Index to determine interactions between plant-derived phenolic acids on hepatotoxicity endpoints in human and rat hepatoma cells. Phytomedicine. 2013; 20:461–468.
- Karthikesan K., Pari L., Menon V.P. Antihyperlipidemic effect of chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin in rats subjected to diabetogenic agents. Chemo-Biological Interactions. 2010; 188: 643–650.
- Karthikesan K., Pari L., Menon V.P. Combined treatment of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid exerts potential anti-hyperglycemic effect on streptozotocin-nicotinamide-induced di-abetic rats. General Physiology and Biophysics. 2010; 29: 23–30.
- Prabhakar P.K., Doble M. Synergistic effect of phytochemicals in combination with hypoglycemic drugs on glucose uptake in myotubes. Phytomedicine. 2009;16: 1119–1126.
- Yahfoufi N., Alsadi N., Jambi M. et al. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. Nutrients. 2018; 10(11):1618.
- Fernandez-Pancho M.S., Villano D., Troncoso A.M. Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2008; 48(7):649–671.
- Righi N., Boumerfeg S., Deghima A. et al. Phenolic profile, safety assessment, and anti-inflammatory activity of *Salvia verbenaca* L. Journal of Ethnopharmacology. 2021; 272: 113940.
- Sajbel' O.L., Radimich A.I., Adamov G.V. i dr. Sravnitel'noe fitohimicheskoe izučenie nadzemnoj chasti dikorastushhego i kul'tiviruemogo rasteniya cikoriya obyknovennogo (*Sichorium intybus* L.). Himija rastitel'nogo syr'ja. 2020; 3:187–195.
- Elgengaihi S., Mossa A-T.H., Refaie A.A. Hepatoprotective Efficacy of *Cichorium intybus* L. Extract Against Carbon Tetrachloride-induced Liver Damage in Rats. Journal of Dietary Supplements. 2016; 13(5):570–584.
- Sajbel' O.L., Radimich A.I., Dargaeva T.D. i dr. Patent RU 2771028. Sposob poluchenija sredstva, obladajushhego gepatoprotekturnym i anti-gepatotoksicheskim dejstviem. Opubl. 25.04.2022.
- Sajbel' O.L., Radimich A.I., Dargaeva T.D. i dr. Fenol'nye soedinenija i gepatoprotekturnaja aktivnost' jekstrakta travy cikoriya obyknovennogo. Razrabotka i registracija lekarstvennyh sredstv. 2021; 10(4):36–45.
- Vichkanova S.A., Kolhir V.K., Sokol'skaja T.A. i dr. Lekarstvennye sredstva iz rastenij (opyt VILAR): nauchnoe izdanie. M. ADRIS. 2009. 432 s.
- Beuter E. Red cell enzyme defects. Hematological Pathology. 1990; 4(3): 103–114.
- Koroljuk M.A., Ivanova M.I., Majorova I.G. i dr. Metod opredelenija aktivnosti katalazy. Laboratornoe delo. M.: Medicina. 1988; 1:1–8.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. The Journal of Biological Chemistry. 1974; 249(22):7130–7139.
- Zhukov A.A., Archakov A.I. Stehiometrija reakcij mikrosomal'nogo oksigenija. Raspređenje redoks-jekvivalen-tov mezdu monoooksigenaznymi i oksidaznymi reakcijami, kataliziruemyimi citohromom R 450. Biohimija. 1985; 50(12):1939–1952.
- Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment. Journal Biological Chemistry. 1964; 7: 2370–2378. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)82245-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)82245-5).
- Lowry O.H., Rosenberg N.Y., Farr A.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193(1): 265–275.
- Karuzina I.I., Bachmanova G.I., Mengazetdinov D.Je., Mjasoedova K.N., Zhihareva V.O., Kuznecova G.I., Archakov A.I. Vydelenie i svojstva citohroma R450 iz mikrosom pečeni krolikov. Biohimija. 1979; 6: 1049–1057.
- Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskih issledovanij lekarstvennyh sredstv. Chast' pervaja. Pod red. A.N. Mironova. M.: Grif i K, 2012. 944 s.
- Gutteridge J.M., Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. Ann. NY Acad. Sci. 2000; 899:136–147.
- Conwell D.G., Jones K.H., Jiang Z., Lantry L.E., Keely P.S.W., Kohar I., Thornton D.E. Cytotoxicity of tocopherols and their quinines in drug-sensitive and multidrug-resistant leukemia cells. Lipids. 1998; 33:295–301.
- Cook N.C., Samman S. Flavonoids chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. J. Nutr. Bio-chem. 1996; 7:66–76.
- Middleton E.J., Kandaswami C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. Biochem Pharmacol. 1992; 43:1167–1179.
- Roger C.R. The nutritional incidence of flavonoids: some physiological and metabolic considerations. Experientia 1988; 44:725–733.
- Bykov V.A., Dubinskaja V.A., Mineeva M.F. i dr. Patent RU № 2181892. Sposob vyjavlenija veshhestv, obladajushhih antioksidantnymi svojstvami, in vitro. Opubl. 27.04.2002.
- Pouille C.L., Ouaza S., Roels E. et al. Chicory: Understanding the Effects and Effectors of This Functional Food. Nutrients. 2022; 14(5):957.
- Epure A., Părvu A.E., Vlase L. et al. Phytochemical profile, antioxidant, cardioprotective and nephroprotective activity of romanian chicory extract. Plants. 2021; 10:64.
- Jasim R.S. Antioxidant, antimicrobial activities and phytochemical constituents of *Cichorium intybus* L. Aerial Parts. Int. J. Bot. 2018; 14:24–29.
- Lukashina T.V., Mineeva M.F., Dubinskaja V.A. i dr. Ispol'zovanie specificheskij fermentnyh biotest-sistem in vitro dlja razrabotki mnogokomponentnogo preparata Stabinorm. Voprosy biologicheskoj, medicinskoj i farmaceuticheskoj himii. 2007; 4: 25–30.
- Ahmed B., Al-Howiriny T.A., Siddiqui A.B. Antihepatotoxic activity of seeds of *Cichorium intybus*. J. Ethnopharmacol. 2003; 87(2–3):237–240.
- Buko V., Zavodnik I., Budryn G. et al. Chlorogenic Acid Protects against Advanced Alcoholic Steatohepatitis in Rats via Modulation of Redox Homeostasis, Inflammation, and Lipogenesis. Nutrients. 2021; 13(11):4155.