

# ВПЛИВ КОМПЛЕКСНОГО ЗАСТОСУВАННЯ ОЦТОВО-КИСЛОГО ЦИНКУ ТА *TRIGONELLA FOENUM GRAECUM* НА КИСНЕЗАЛЕЖНИЙ МЕТАБОЛІЗМ МАКРОФАГІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

*Н.В. Яворська, інженер, М.П. Рудик, к.біол.н., І.О. Мележик, студент, В.М. Святецька, інженер, О.П. Гаділія, провідний інженер, О.С. Моложава, к.біол.н., В.К. Позур, д.біол.н.*

*Навчально-науковий центр "Інститут біології", Київський національний університет імені Тараса Шевченка, м. Київ*

**РЕЗЮМЕ.** Досліджено вплив оцтовокислого цинку та фенугрека (*Trigonella foenum*) на метаболізм перитонеальних макрофагів у щурів із хронічною алкогольною інтоксикацією. Виявлено, що хронічна алкогольна інтоксикація помірно активує киснезалежний метаболізм перитонеальних макрофагів щурів. Показано, що застосування екстракту насіння фенугрека протягом 28 днів значно стимулює "кисневий вибух" у макрофагах щурів із алкогольною інтоксикацією. Найбільш ефективною виявилась комбінація екстракту фенугрека та оцтовокислого цинку, що супроводжувалось найвищими показниками функціональної активності цих клітин.

*Ключові слова:* алкогольна інтоксикація, фенугрек, оцтовокислий цинк, перитонеальні макрофаги.

**РЕЗЮМЕ.** Изучено влияние уксуснокислого цинка и фенугрека (*Trigonella foenum*) на метаболизм перитонеальных макрофагов у крыс с хронической алкогольной интоксикацией. Обнаружено, что хроническая алкогольная интоксикация умеренно активизирует кислородзависимый метаболизм перитонеальных макрофагов крыс. Показано, что применение экстракта семян фенугрека на протяжении 28 суток значительно стимулирует "кислородный взрыв" в макрофагах крыс с алкогольной интоксикацией. Наиболее эффективной оказалась комбинация экстракта фенугрека и уксуснокислого цинка, использование которой сопровождалось наивысшими показателями функциональной активности этих клеток.

*Ключевые слова:* алкогольная интоксикация, фенугрек, уксуснокислый цинк, перитонеальные макрофаги.

**SUMMARY.** The effect of acetic zinc and fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) on peritoneal macrophage metabolism in rats under chronic alcoholic intoxication was investigated. Chronic ethanol treatment resulted in moderated macrophage oxidative metabolic activity in rats. It is shown that the use of fenugreek seed extract for 28 day increases respiratory burst in peritoneal macrophages in rats with chronic alcoholic intoxication. Maximal stimulating effect on the metabolism of these cells exerted the combined treatment of rats with acetic zinc and fenugreek.

*Key words:* alcoholic intoxication, fenugreek, acetic zinc, peritoneal macrophages.

Вживання алкоголю викликає не лише порушення антиоксидантної системи та метаболічних процесів у печінці, а й спричиняє значні імуномодуляторні ефекти [1, 2]. Зміни, що відбуваються в реакціях імунної системи під впливом алкогольної інтоксикації, залежать від тривалості дії алкоголю на організм. Як при гострому, так і хронічному його застосуванні виявлено зниження імунної відповіді, зміни продукції цитокінів та імуноглобулінів, пошкодження функцій ефекторних клітин імунітету, процесів антигенної презентації тощо. Серед клітин імунної системи одними із найбільш чутливих до дії алкоголю можна назвати клітини Купфера, що відносяться до резидентних макрофагів печінки. Однак відзначають також вплив алкогольної інтоксикації на функціонування нейтрофілів, фагоцитарних моноцитів та макрофагів [1, 3, 4]. За хронічної дії алкоголю відбувається посилення продукції цитокінів прозапального профілю, таких як ФНП- $\alpha$ , ІЛ-1 та ІЛ-6, що синтезуються активованими ефекторними клітинами [1, 5]. Цей процес пов'язують, в першу чергу, із деструктивними ураженнями

печінки. В той же час гостра інтоксикація алкоголем асоційована зі зменшенням рівня даних цитокінів запалення [1]. Однак синтез активних радикалів кисню, продуктів так званого "кисневого вибуху", відіграє ключову роль у протимікробній та протипухлинній функції клітин моноцитарно-макрофагального ряду. Тому зниження метаболічної активності цих клітин негативно позначається на загальній імунореактивності організму. Як виявлено, при застосуванні алкоголю як у хронічному, так і гострому режимах, у щурів зменшується продукція супероксидного аніону, перекису водню та оксиду азоту альвеолярними макрофагами [1, 3]. Таким чином, вплив алкоголю на цю ланку клітинного імунітету має подвійний характер та неоднозначні наслідки для організму.

Серед розмаїття препаратів, що досліджуються з метою полегшення або запобігання токсичних ефектів алкоголю на організм, чільне місце належить препаратам цинку. Відомо, що вживання алкоголю призводить до розвитку дефіциту цинку, який є необхідним елементом для нормального функціонування імунної

та антиоксидантної систем. За даними експериментальних досліджень, дефіцит цього важливого елементу асоційований із порушеннями функцій альвеолярного епітелію та макрофагів. Введення цинку в харчовий раціон щурів, яким одночасно вводили алкоголь, відновлювало функціональну активність вказаних клітин та зменшувало синтез ФНП- $\alpha$  [3].

Останнім часом увагу дослідників привернули потенційні протекторні ефекти фенугрека (*Trigonella foenum graecum*), що проявляються у зниженні рівня продуктів пероксидного окислення ліпідів, утворення яких характерне за тривалої дії етанолу [2]. У тварин при алкогольній інтоксикації застосування екстрактів насіння фенугрека також підвищує активність антиоксидантних ферментів, відновлює рівень тіольних груп, знижує накопичення колагену та ліпідів у печінці (процес пов'язаний із ожирінням та фіброзом печінки при хронічній дії алкоголю), а також рівень апоптозу гепатоцитів [2, 3, 6]. Крім гепатопротекторного ефекту виявлено також протипухлинні та імуномодуляторні властивості препаратів фенугрека. Показана його здатність підвищувати вагові та клітинні показники лімфоїдних органів, зокрема тимусу та кісткового мозку, активувати гуморальний імунітет та фагоцитарну функцію макрофагів [7]. Але, дані щодо імуномодуляторних властивостей фенугрека при алкогольній інтоксикації майже відсутні. Тому **мета нашої роботи**: дослідити вплив на перитонеальні макрофаги комплексного застосування оцтовокислого цинку та фенугрека (*Trigonella foenum graecum*) при хронічній формі інтоксикації алкоголем у щурів.

**Матеріали і методи.** У роботі дотримувались міжнародних рекомендацій щодо проведення медико-біологічних досліджень з використання тварин згідно з Європейською конвенцією. Дослідження проводили на щурах (самцях) лінії Вістар масою 180-200 г розведення віварію ННЦ "Інститут біології" КНУ імені Т. Шевченка. Тварини утримувались на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до води.

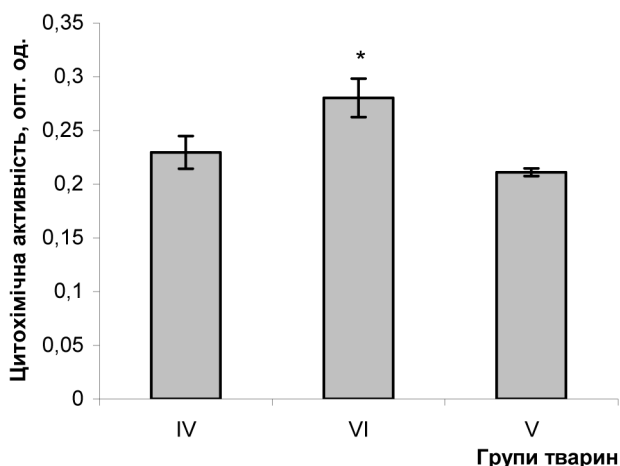
Експериментальну хронічну алкогольну інтоксикацію викликали за стандартною методикою М. Х. Халілова і Ш. А. Закирходжаєва 40 етиловим спиртом, що вводився перорально з розрахунку 2 мл (щурі, що вживали високі дози алкоголю) на 100 г маси тварини раз на добу протягом 30 діб [8]. При цьому у щурів моделювали преференційне вживання алкоголю. Лікування починали з 30 доби алкогольної інтоксикації: препарати оцтовокислого цинку (в дозі 0,2 г на 100 г маси тварини) та фенугрека (в дозі 50 мг на 1 кг маси тварини розчи-

неній в 1мл фізіологічного розчину) вводили інтрагастрально (внутрішньошлунково) один раз на добу протягом 28 діб одночасно із подальшим введенням спирту. Препарат порошку з насіння фенугрека (*Trigonella foenum graecum*) був наданий відділом медичних та ароматичних рослин Інституту рослинництва Західноугорського університету. Тварини були розділені на 5 груп: I група — щури з хронічною алкогольною інтоксикацією, яким додатково вводили водний розчин порошку насіння фенугрека; II група — щури з хронічною алкогольною інтоксикацією, яким додатково вводили цинк; III — щури з хронічною алкогольною інтоксикацією, яким додатково вводили цинк та фенугрек; IV — контрольні щури з хронічною алкогольною інтоксикацією; V — інтактні контрольні тварини. Додатково була створена VI група щурів, у яких викликали за вказаною вище методикою хронічну алкогольну інтоксикацію середньою дозою етилового спирту — 1 мл на 100 г маси (щурі, що вживали середні дози алкоголю).

Функціональну активність перитонеальних макрофагів досліджували за рівнем активності киснезалежного метаболізму на 7, 14, 21, 28 добу після початку лікування. Киснезалежний метаболізм визначали за відновленням нітросинього тетразолію (НСТ) [9]. Оптичну густину відновленого НСТ визначали на мікроплетфотометрі "Reader" (МП "Лаботек", Латвія) при довжині хвилі 630 нм.

**Результати та їх обговорення.** Численні дані літератури свідчать про порушення в системі імунітету під впливом алкоголю. Причому ці порушення мають різноспрямований характер. Відомо, що під час алкогольної інтоксикації пошкоджуються функції клітин імунної системи: моноцитів, макрофагів, нейтрофілів. Якщо гостра дія алкоголю призводить до зниження рівня запальних реакцій в організмі, то хронічний перебіг алкогольної інтоксикації викликає запальну активацію ефекторних клітин імунної системи в печінці та, як наслідок, її ураження. В той же час альвеолярні макрофаги демонструють зниження функціональної активності під впливом алкоголю. Результати наших досліджень свідчать про те, що хронічне вживання алкоголю викликає незначне зростання киснезалежного метаболізму перитонеальних макрофагів у щурів на 58 добу (рис.1). Причому менші дози алкоголю (1 мл на 100г маси) достовірно підвищують даний показник, тоді як у щурів із алкогольною інтоксикацією високими дозами (2 мл на 100 г маси) цитохімічна активність макрофагів була на рівні інтактного контролю.

Наступним етапом була оцінка киснезалежного метаболізму у щурів з хронічною алко-



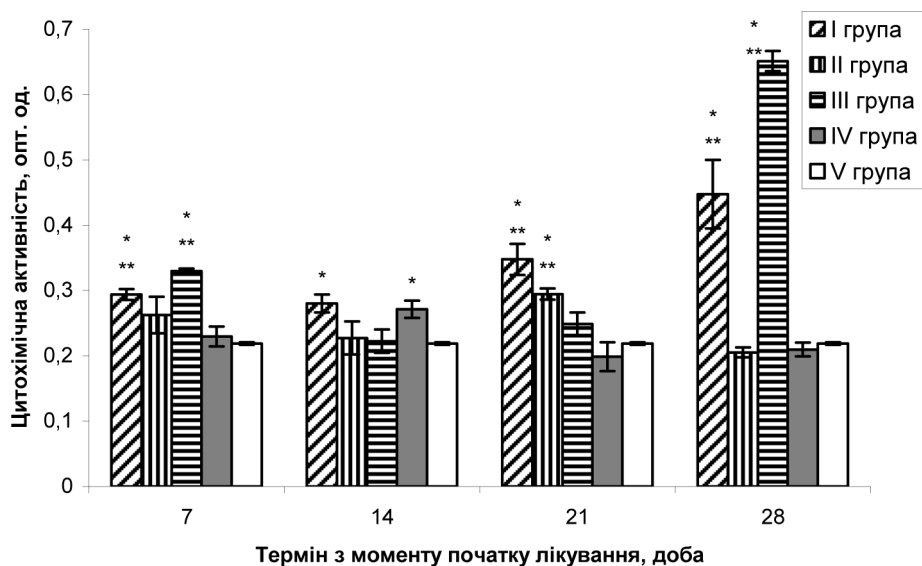
**Рис. 1.** Вплив хронічної алкогольної інтоксикації на киснезалежний метаболізм макрофагів у щурів (51 доба інтоксикації).

Групи тварин: IV – щури з хронічним вживанням високих доз (2 мл на 100 г маси) алкоголю; VI – щури з хронічним вживанням середніх доз (1 мл на 100 г маси) алкоголю; V – інтактні контрольні щури. Примітка: \* –  $p < 0,05$  порівняно з інтактним контролем.

гольною інтоксикацією високими дозами (2 мл на 100 г маси) при лікуванні оцтовокислим цинком та фенугреком. При хронічній інтоксикації алкоголем на початкових етапах спостереження спостерігалася тенденція щодо зростання метаболічної активності макрофагів щурів (рис. 2). На 14 добу після початку лікування у контрольних тварин з хронічною алкогольною інтоксикацією цей показник був достовірно вищим у порівнянні з інтактним конт-

ролем ( $p < 0,05$ ). Активація макрофагів мала тимчасовий характер і до кінця періоду спостереження (28 доба лікування) відбувалось зниження киснезалежного метаболізму макрофагів до рівня контролю.

Одним із терапевтичних підходів при алкогольній інтоксикації є застосування препаратів цинку. Відновлення нормального вмісту цього елемента в організмі, що порушується під впливом алкоголю, сприяє зменшенню рівня ФНП- $\alpha$  у печінці та нормалізації функціонального стану фагоцитів [3]. Нами було поєднано застосування оцтовокислого цинку та фенугрека, котрий, як відомо, володіє гепатопротекторними, анальгетичними, антиоксидантними та імуномодуляторними ефектами [7, 10]. Встановлено, що таке комплексне застосування двох препаратів призводило до активації "кисневого вибуху" у перитонеальних макрофагах. Даний показник досягав максимуму в цій групі (III) на 28 добу лікування і становив понад утричі більше значення порівняно із обома контрольними групами ( $p < 0,05$ ) (Рис. 2). Очевидно, що такий ефект був здебільшого притаманний фенугреку, адже його застосування в монорежимі (I група) також призводило до поступового зростання цитохімічної активності макрофагів протягом усього періоду лікування, достовірного у порівнянні із контрольними значеннями. Як припускають, відповідальними за імуномодуляторні ефекти насіння цієї лікарської рослини є біологічно активні речовини у її складі. До таких, зокрема, належать протодіосцин, діосгенін та вамо-



**Рис. 2.** Вплив застосування оцтовокислого цинку та фенугрека на метаболічну активність перитонеальних макрофагів у щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією.

I група – щури з хронічною алкогольною інтоксикацією, яким вводили фенугрек, II група – щури з хронічною алкогольною інтоксикацією, яким вводили цинк, III – щури з хронічною алкогольною інтоксикацією, яким вводили цинк та фенугрек, IV – контрольні щури з хронічною алкогольною інтоксикацією; V – інтактні контрольні щури.

Примітка: \* –  $p < 0,05$  порівняно з інтактним контролем, \*\* –  $p < 0,05$  порівняно з контрольними тваринами з хронічною алкогольною інтоксикацією.

генін і тригонеозид, найбільш дослідженим із яких є стероїдний сапонін — діосгенін [2].

На відміну від цього, оцтовокислий цинк в монорежимі (II група) не спричиняв значних впливів на метаболізм перитонеальних макрофагів щурів із алкогольною інтоксикацією (рис. 2.). Достовірно вищим за контрольні значення цей показник був лише на 21 добу його застосування.

Як видно, рівень киснезалежного метаболізму перитонеальних макрофагів залежав від тривалості застосування фенугрека, адже наприкінці досліджуваного періоду (28 доба лікування) у щурів I та III груп цей показник сягав максимальних значень. При цьому одночасне введення оцтовокислого цинку додатково підвищувало його.

**Висновки.** Таким чином, найбільш ефективним для активації "кисневого вибуху" перитонеальних макрофагів під час алкогольної

інтоксикації у щурів є комплексне застосування оцтовокислого цинку та фенугрека. В цілому, стимулювання макрофагальної ланки природного імунітету є позитивним ефектом, що може відігравати важливу роль у випадку порушень імунного захисту під впливом алкоголю. Адже макрофаги виконують важливі функції в протимікробному та протипухлинному захисті організму, беруть участь у процесах запалення. Тому здатність моделювати їх активність є важливим аспектом у процесі відновлення імунного статусу при алкогольній інтоксикації, що, як відомо, асоційована із порушеннями в системі імунітету. Застосування препарату фенугрека та комбінування його із препаратами цинку, як було показано, може мати потенційні переваги у цьому напрямку, адже воно поєднує імуномодуляторні ефекти речовин рослинного походження та імунотропні властивості цинку.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Szabo G. Consequences of alcohol consumption on host defence / G. Szabo // *Alcohol Alcohol.* — 1999. — № 6. — P. 830—841.
2. Kaviarasan S. Protective action of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seed polyphenols against alcohol-induced protein and lipid damage in rat liver / S. Kaviarasan, R. Sundarapandiyam, C.V. Anuradha // *Cell Biol. Toxicol.* — 2008. — № 5. — P. 391—400.
3. Zinc Supplementation Restores PU.1 and Nrf2 Nuclear Binding in Alveolar Macrophages and Improves Redox Balance and Bacterial Clearance in the Lungs of Alcohol-Fed Rats / A.J. Mehta, P.C. Joshi, X. Fan [et al.] // *Alcohol Clin. Exp. Res.* — 2011. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2011.01488.x
4. Adiponectin and heme oxygenase-1 suppress TLR4/MyD88-independent signaling in rat Kupffer cells and in mice after chronic ethanol exposure / P. Mandal, S. Roychowdhury, P.H. Park [et al.] // *J. Immunol.* — 2010. — № 8. — P. 4928—4937.
5. Monocyte activation in alcoholic liver disease / C. J. McClain, D.B. Hill, Z. Song [et al.] // *Alcohol.* — 2002. — № 1. — P. 53—61.
6. Kaviarasan S. Fenugreek seed (*Trigonella foenum graecum*) polyphenols inhibit ethanol-induced collagen and lipid accumulation in rat liver / S. Kaviarasan, P. Viswanathan, C. V. Anuradha // *Cell Biol. Toxicol.* — 2007. — № 6. — P. 373—383.
7. Bin-Hafeez B. Immunomodulatory effects of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) extract in mice / B. Bin-Hafeez, R. Haque, S. Parvez // *Int. Immunopharmacol.* — 2003. — № 2. — P. 257—265.
8. Халилов М.Х. К характеристике некоторых патохимических сдвигов в крови, тканях печени и головного мозга при экспериментальной алкогольной интоксикации / М.Х. Халилов, Ш.Я. Закиходжаев // *Вопросы клиники алкоголизма: Сб. науч. тр., Ташкент, 1983.* — С. 38—41.
9. Иммунный статус, принципы его оценки и коррекции иммунных нарушений / В.Г. Передерий, А.М. Земсков, Н.Г. Бычкова, В.М. Земсков. — К.: Здоров'я, 1995. — 211 с.
10. Sushma N. Aqueous extract of *Trigonella foenum graecum* (fenugreek) prevents cypermethrin-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity / N. Sushma, T. Devasena // *Hum. Exp. Toxicol.* — 2010. — № 4 — P. 311—319.

Надійшла до редакції 27.09.2011 р.

Надійшла до редакції