

DOI: <https://doi.org/10.22263/2312-4156.2025.2.9>

Иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства растительных полифенолов (хлорогеновой кислоты, нарингина) при хронической алкогольной интоксикации

В.Л. Мороз, Е.Б. Белоновская, А.В. Романчук, В.Ч. Полубок, И.А. Кузьмицкая, Т.А. Бородина, А.А. Островский, А.Г. Шляхтун, Л.И. Надольник

Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие
«Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси»,
г. Гродно, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2025. – Том 24, №2. – С. 9-19.

Immunomodulatory and anti-inflammatory properties of plant polyphenols (chlorogenic acid, naringin) in chronic alcohol intoxication

V.L. Moroz, E.B. Belonovskaya, A.V. Romanchuk, I.A. Kuzmitskaya, V.Ch. Polubok, T.A. Borodina, A.A. Astrowski, A.H. Shlyahatun, L.I. Nadolnik

Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus,
Grodno, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2025;24(2):9-19.

Резюме.

Хроническое употребление этанола является причиной развития социально значимых заболеваний человека. Разработка лекарственных средств и биологически активных добавок направлена на снижение зависимости от алкоголя, а также лечение заболеваний, индуцируемых его избыточным употреблением.

Цель – изучить иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства растительных полифенолов (хлорогеновой кислоты (ХГК), нарингина (НГ)) и их композиции на модели хронической алкогольной интоксикации у крыс, а также в исследованиях *in vitro*.

Материал и методы. На моделях хронической алкогольной интоксикации (ХАИ, употребление 10 % раствора этанола в качестве единственного источника жидкости) проведено тестирование ХГК (40 мг/кг) и НГ (40 мг/кг), а также композиции ХГК+НГ (40 мг/кг+20 мг/кг): на фоне употребления этанола (28 нед.) и после его отмены. В сыворотке крови определялись маркеры воспаления, фагоцитарная и метаболическая активность нейтрофилов; в печени и сердце оценивалась степень очаговой лейкоцитарной инфильтрации.

Результаты. Введение ХГК и НГ в течение 4 недель повышало фагоцитарную активность до максимальных значений и снижало метаболическую активность нейтрофилов. Лучшие иммуномодулирующие свойства показаны для композиции ХГК+НГ. Противовоспалительная активность полифенолов проявлялась снижением количества очагов лейкоцитарной инфильтрации, их площади в сердце и печени, активности миелопероксидазы, уровня TNF-1α в крови, нормализацией формулы крови. В исследованиях *in vitro* установлено, что эффекты композиции ХГК+НГ (2:1) наиболее эффективно восстанавливали сниженный ФИ, оптимизировали повышенную метаболическую активность нейтрофилов.

Заключение. ХГК и НГ, их композиция, представляют интерес для коррекции вторичных иммунодефицитов при ХАИ, а также снижения степени алкогольного поражения сердца и печени.

Ключевые слова: хроническая алкогольная интоксикация, иммуномодулирующие свойства, противовоспалительные свойства, TNF-1α, хлорогеновая кислота, нарингин.

Abstract.

Chronic ethanol consumption is the cause of developing socially significant human diseases. The development of drugs and biologically active supplements is aimed at reducing alcohol dependence, as well as treating diseases induced by its excessive consumption.

Objectives. To investigate immunomodulatory and anti-inflammatory properties of plant polyphenols (chlorogenic acid (CGA), naringin (NG)) and their compositions in rats subjected to chronic alcohol intoxication as well as in vitro studies. **Material and methods.** CGA (40 mg/kg) and NG (40 mg/kg) as well as the composition of CGA and NG (40 mg/kg+20 mg/kg) were tested on the model of chronic alcohol intoxication (CAI, consumption of 10% ethanol solution as the only source of liquid): against the background of ethanol consumption (28 weeks) and after its withdrawal. Inflammatory markers, phagocytic (PI, %) and metabolic activity of neutrophils were determined in the blood serum; the degree of leukocyte infiltration was assessed in the liver and the heart.

Results. The introduction of CGA and NG during 4 weeks increased PI to maximum values and decreased the metabolic activity of neutrophils. The best immunomodulatory properties are shown for the composition of CGA + NG. The anti-inflammatory activity of polyphenols was manifested by the decrease in the number of foci of leukocyte infiltration, their area in the liver and the heart, myeloperoxidase activity, the level of TNF-1 α in the blood, and normalization of the blood count. In vitro studies have shown that the effects of the composition of CGC+NG (2:1) most effectively restored reduced FI and optimized the increased metabolic activity of neutrophils.

Conclusions. CGA and NG, their composition is fascinating for the correction of secondary immunodeficiencies in chronic alcohol intoxication, as well as reducing the degree of alcoholic damage to the heart and the liver.

Keywords: *chronic alcohol intoxication, immunomodulatory properties, anti-inflammatory properties, TNF-1 α , chlorogenic acid, naringin.*

Введение

Хроническое употребление этанола является причиной развития социально значимых заболеваний человека. Возможные аспекты её решения – разработка лекарственных средств и биологически активных добавок (БАД) для предотвращения и коррекции зависимости от этанола, а также лекарственных средств для лечения заболеваний, индуцируемых избыточным употреблением алкоголя.

Хорошо известно, что основные органы-мишени этанола – это мозг, сердце, печень. Избыточное употребление этилового спирта вызывает развитие алкогольной жировой болезни печени (алкогольный стеатогепатит), алкогольного поражения сердца (алкогольная кардиомиопатия (АКМП)) [1]. АКМП рассматривается как основная причина ранней смертности людей, избыточно употребляющих этанол, механизмы формирования АКМП окончательно не установлены [2]. Представляет научный и практический интерес поиск новых лекарственных средств на основе растительных субстанций для снижения алкоголь-индуцированного повреждения сердца, печени, нарушения функции иммунной системы.

Для проведения поисковых исследований нами были выбраны два растительных полифенола: хлорогеновая кислота (ХГК; Chlorogenic Acid, CGA) и нарингин (НГ; naringin, NG). ХГК (1,3,4,5-тетрагидроксициклогексан карбоновая кислота 3-(3,4-ди- гидроксидинамат) в достаточном количестве содержится в зернах зеленого кофе, в меньших количествах в некоторых лекарственных растениях, таких как корень цикория, листья

черники обыкновенной, трава арники горной, ромашки лекарственной и других. ХГК оказывает антиоксидантное, антиканцерогенное, противовоспалительное и анальгетическое действие [3, 4]. НГ – 4',5,7-тригидроксифлавонон-7-рамноглюкозид, представляет собой основной флавононовый гликозид, получаемый из грейпфрутов и других цитрусовых. Экспериментально подтверждено, что он обладает многочисленными биологическими свойствами, такими как антиоксидантные, противовоспалительные и антиапоптотические. Введение НГ уменьшает гипертрофию миокарда у старых животных, улучшает пост-ишемическое восстановление функциональных параметров сердца. Под действием НГ снижались повышенные уровни сывороточных белков: ЛДГ, креатинкиназы-МВ (КК-МВ), TNF- α у старых крыс [5]. Представленные данные предполагают хорошие гепато- и кардиопротекторные эффекты при использовании данных полифенолов на фоне ХАИ.

Данные об иммуномодулирующих свойствах исследуемых полифенолов при ХАИ в доступной литературе отсутствуют, что представляет интерес для проведения настоящих исследований, учитывая, что длительное употребление этанола обладает иммуносупрессивным действием. Показано, что при ХАИ в течение 20 суток у крыс отмечается снижение функции Th1-лимфоцитов и в меньшей степени – Th2-клеток, а также концентрации цитокинов ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10 [6].

Цель исследования – изучить иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства растительных полифенолов (хлорогеновой кислоты, нарингина) и их композиции на модели

хронической алкогольной интоксикации у крыс, а также в исследованиях *in vitro*.

Материал и методы

Исследования выполнены на самцах крыс массой 280-320 г двух экспериментальных моделей ХАИ: употребление 10% раствора этанола в качестве единственного источника жидкости на протяжении 24 (модель № 1) или 28 недель (модель № 2) в режиме свободного доступа в течение суток («добровольное» употребление) [7]. Моделировалось поражение внутренних органов животных: АКМП и алкогольное поражение печени. Все исследования проведены с соблюдением этических норм отношения к лабораторным животным.

Количество животных в модели № 1 – 40 шт. ($n=10$, в группе), в модели № 2 – 50 шт. ($n=10$, в группе). Схема двух моделей включала следующие группы: интактный контроль, ХАИ, ХАИ+ХГК (40 мг/кг), ХАИ+НГ (40 мг/кг). В модели № 2 введена дополнительная группа, которая получала композицию ХГК+НГ (40+20 мг/кг). В модели № 1 и № 2 животные употребляли 10% раствор этанола в течение 24 нед., на фоне полноценного рациона вивария. Водные растворы ХГК и НГ вводились внутривентрально, в течение 28 суток на протяжении 25-28 нед. эксперимента: модель № 1 – на фоне отмены этанола (восстановительный период в течение 4 недель); модель № 2 на фоне употребления этанола.

В гепаринизированной крови определяли факторы врожденного иммунитета: фагоцитарную активность нейтрофилов по фагоцитарному индексу (ФИ, %) [8], метаболическую активность нейтрофилов с подсчетом нейтрофилов, восстанавливающих нитросиний тетразолий (% НСТ-позитивных клеток) [8], лейкоцитарную формулу крови. В сыворотке крови выявляли циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК, у.е.), с использованием полиэтиленгликоля [8] и оценивали комплементарную активность по 50% гемолизу эритроцитов барана (CH50) [8]. Лимфоциты из гомогенатов печени выделяли центрифугированием при 4000 об/мин в градиенте плотности верографина (1,076 г/см³). Для расчета концентрации использовали камеру Горяева.

Концентрацию провоспалительного цитокина фактора некроза опухоли (ФНО-1 α) измеряли методом ИФА, согласно инструкции производителя («BTLab», Китай). Активность миелопероксидазы (МПО) измерялась по методу Bozeman P. [9].

Для гистологического исследования фрагменты сердца и печени крыс фиксировали, обезжировали, далее заключали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм изготавливали на микротоме (Leica RM2125, Германия), окрашивали гематоксилином и эозином и по методу Маллори [10]. Изучение препаратов, морфометрию и микрофотографирование проводили, используя микроскоп Leica DM 6B, оснащенный цифровой фотокамерой, и компьютерную программу анализа изображений Image-Pro Plus (NIH, USA). Очаги лейкоцитарной инфильтрации в ткани печени оценивались подсчетом воспалительных фокусов, состоящих из 3 и более клеток в 10 случайных полях зрения. В сердце крыс площадь лейкоцитарной инфильтрации оценивали методом морфометрии (мкм²/мм² среза ткани сердца).

В опытах *in vitro* иммуномодулирующие свойства полифенолов оценивали по их влиянию на фагоцитарную и метаболическую активность нейтрофилов, используя нагрузочные тесты по методу Новикова Д.К. [8]. ФИ определяли по поглощению частиц латекса (1,5 мкм, ООО «Аналиткомплект», Россия). В круглодонные иммунологические планшеты вносили кровь, частицы латекса (3:1), ХГК или НГ (в концентрациях 1 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,01 мг/мл и 0,001 мг/мл, 0,0001 мг/мл). Состав композиций ХГК и НГ тестируемых *in vitro* представлен в таблице 1. Количественную оценку реакции проводили с помощью масляно-иммерсионной микроскопии (Olympus CX-4, Япония). Определялось относительное количество нейтрофилов, содержащих поглощенные частицы латекса (рис. 1).

Статистический анализ результатов проведен с использованием общепринятых критериев в программе «Statistica 12». Отклонение распределения значений показателя в выборке от нормального оценивали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Данные представлены в виде $M \pm SD$, где M – среднее, SD – стандартное отклонение, в случае нормального распределения; в виде Median [Q25:Q75] в случае не нормального распределения, где Median – медиана, а Q25:Q75 – нижний и верхний квартиль соответственно. Статистически значимыми считались результаты при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В таблицах 2-4 представлены результаты исследования иммуномодулирующих свойств ХГК,

Таблица 1 – Состав композиций хлорогеновой кислоты и нарингина тестируемых *in vitro*

№ Композиции	Хлорогеновая кислота	Нарингин
1	100 мкл 0,001 мг/мл	20 мкл 0,0001 мг/мл
2	100 мкл 0,001 мг/мл	50 мкл 0,001 мг/мл
3	100 мкл 0,001 мг/мл	50 мкл 0,01 мг/мл
4	100 мкл 0,001 мг/мл	50 мкл 0,1 мг/мл

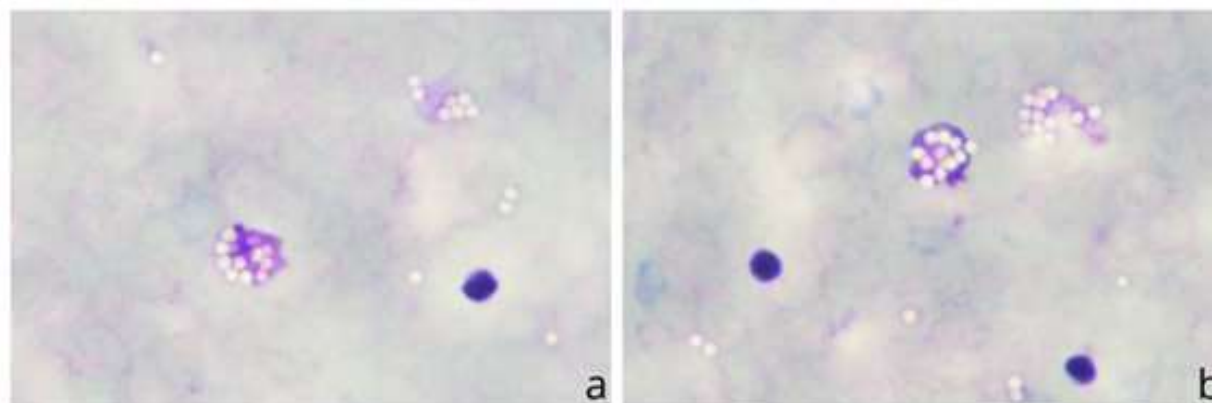


Рисунок 1 – Влияние композиций хлорогеновой кислоты и нарингина на фагоцитарную активность нейтрофилов *in vitro*. На фото, для наглядности представлены результаты фагоцитоза – большое количество поглощенных нейтрофилами частиц латекса (стрелки) свидетельствует о высокой фагоцитарной активности и фагоцитарном числе (примеры на фото а и б), окраска по Романовскому, масло иммерсия, об. $\times 100$

НГ, а также композиции ХГК+НГ на модели ХАИ у крыс (модель №1 и №2). Установлено, что ХАИ проявляется снижением фагоцитарной активности нейтрофилов в пределах референтных значений ($72,67 \pm 9,71\%$; контроль – $82,50 \pm 8,94\%$, $p < 0,05$) на фоне повышения метаболической активности клеток в НСТ-тесте (в 1,61 раза, $p < 0,05$). Показатель ЦИК повышался в 1,65 раза; значимых изменений в формуле крови не обнаружено.

Введение ХГК в течение 4 недель, в дозе 40 мг/кг повышало ФИ до максимального значения ($90,50 \pm 4,85\%$), в 1,25 раза по сравнению с группой ХАИ ($p < 0,05$, табл. 2). Эффекты ХГК проявлялись снижением метаболической активности нейтрофилов до контрольных значений (в 1,98 раза по сравнению с группой ХАИ, $p < 0,05$), отмечена нормализация уровня моноцитов, сегментоядерных (с/я) нейтрофилов. При введении НГ в той же дозе эффект еще более значим по отношению к группе ХАИ: повышение ФИ в 1,2 раза ($p < 0,05$) на фоне снижения метаболической активности нейтрофилов в 1,46 раза ($p < 0,05$), а также снижения содержания в крови моноцитов (в 2,03 раза, $p < 0,05$).

Только при введении опытным животным композиции полифенолов выявлена нормализация значений показателей: ЦИК, содержание с/я ней-

трофилов, моноцитов, но отмечено повышение в 1,29 раза содержания лимфоцитов в крови (табл. 2). Нормализация показателя ФИ, активация метаболической активности нейтрофилов (повышение в 1,23 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой ХАИ и в 1,98 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой контроль) показана при введении композиции ХГК+НГ (40+20 мг/кг) на фоне ХАИ.

Поскольку, выявленные эффекты исследуемых полифенолов и их композиции проявлялись на фоне употребления этанола при ХАИ, их можно расценить, как защитные или иммуномодулирующие. ХГК и НГ повышали функциональную активность факторов врожденного иммунитета, о чем свидетельствуют максимальные значения ФИ. Согласно результатам ряда исследований, это может быть опосредовано усилением экспрессии рецепторного аппарата нейтрофилов, активацией процессов распознавания и поглощения антигенов [11]. Изменения рецепторного аппарата нейтрофилов, как усиление, так и угнетение экспрессии рецепторов нейтрофилов, показаны при развитии ряда заболеваний. Метаболическая активность нейтрофилов изменялась разнонаправленно под действием ХГК и композиции ХГК+НГ, что представляет интерес с точки зрения оценки регуляторных эффектов тестируе-

Таблица 2 – Влияние хлорогеновой кислоты, нарингина и композиции ХГК+НГ на иммунологические и гематологические показатели крови крыс при хронической алкогольной интоксикации в течение 28 недель

Показатель	Контроль n=6	ХАИ n=6	ХАИ+ХГК 40 мг/кг n=6	ХАИ+НГ 40 мг/кг n=7	ХАИ+ХГК+НГ (40+20) мг/кг n=7
ФИ, %	82,50±8,94	72,67±9,71	90,50±4,85 ^b	86,87±9,48 ^b	82,57±7,87
НСТ, %	21,17±8,08	34,00±9,10 ^a	17,17±5,64 ^b	23,17±1,83 ^c	41,86±7,22 ^{a,c,d}
ЦИК, у.е.	73,00±14,99	120,3±67,98	114,00±37,59	99,89±30,16	67,33±36,67
Палочкоядерные нейтрофилы, %	4,20±2,86	4,50±3,02	4,71±2,21	5,17±0,75	3,50±1,87
Сегментоядерные нейтрофилы, %	14,50 [12,00:22,00]	25,00 [15,00:30,00]	16,00 [13,00:26,00]	23,00 [20,00:27,00]	13,00 [12,00:14,00] ^f
Эозинофилы, %	5,00 [5,00:5,00]	2,00 [2,00:2,00]	5,00 [2,00:9,00]	5,00 [4,00:9,00]	2,00 [1,00:3,00] ^g
Моноциты, %	7,50±4,51	12,17±3,76	7,57±3,55	6,00±2,31 ^b	10,00±1,58
Лимфоциты, %	70,00±7,42	56,00±13,22	64,00±10,98	59,71±8,56	72,20±1,30 ^c

Примечание: ^a – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ^b – $p < 0,05$ по сравнению с ХАИ; ^c – $p < 0,05$ по сравнению с ХАИ+ХГК; ^d – $p < 0,05$ по сравнению с ХАИ+НГ; ^e – $0,05 < p < 0,1$ по сравнению с ХАИ; ^f – $0,05 < p < 0,1$ по сравнению с ХАИ+ХГК; ^g – $0,05 < p < 0,1$ по сравнению с ХАИ+НГ

Таблица 3 – Влияние хлорогеновой кислоты, нарингина и композиции ХГК+НГ на концентрацию лимфоцитов в печени крыс при хронической алкогольной интоксикации в течение 28 недель, тыс. кл/мкл

Контроль n=6	ХАИ n=4	ХАИ+ХГК 40 мг/кг n=6	ХАИ+НГ 40 мг/кг n=6	ХАИ+ХГК+НГ (40+20) мг/кг n=6
19,00±3,54	28,63±1,88	16,25±9,78 ^b	22,83±4,76	15,21±5,65 ^b

Примечание: ^b – $p < 0,05$ по сравнению с ХАИ

мых полифенолов. При ХАИ отмечалось усиление метаболической активности нейтрофилов, что характерно для течения воспалительных процессов. Следовательно, снижающий эффект ХГК можно расценить как противовоспалительный, эффекты её введения в комплексе с НГ требуют дальнейших исследований.

Противовоспалительные свойства тестируемых полифенолов, а также их комплекса проявлялись снижением выраженности воспалительных процессов в печени. При их введении на протяжении 4 недель на фоне ХАИ, повышенная в 1,5 раза в печени крыс концентрация лимфоцитов снижалась: в 1,76 раза ($p < 0,05$) при введении ХГК, в 1,88 раза ($p < 0,05$), на фоне – композиции ХГК+НГ, и менее значимо при введении НГ (табл. 3).

Даже через 4 недели после отмены этанола, сохранялась повышенной метаболическая активность нейтрофилов (на 198,97%) в крови крыс после ХАИ (табл. 4). Введение ХГК и НГ снижало данный показатель: ХГК в 1,60 раза ($p < 0,05$) по

сравнению с группой ХАИ; НГ до контрольных значений (в 2,99 раза, $p < 0,05$). Можно отметить, что на фоне отмены этанола НГ снижал метаболическую активность нейтрофилов более значимо, чем ХГК (табл. 4), но на фоне введения этанола более выраженные эффекты отмечены у ХГК (табл. 2).

ХГК и НГ восстанавливали сниженную при ХАИ активность системы комплемента, при этом действие НГ было более эффективным (повышение в 1,23 раза, $p < 0,05$). На протяжении восстановительного периода в группе ХАИ сохранялось повышенным относительное количество п/я нейтрофилов (в 3 раза, $p < 0,05$) и снижено количество лимфоцитов (в 1,18 раза, $p < 0,05$) по сравнению с контролем. Введение ХГК и НГ нормализовало гематологические показатели крови крыс (табл. 4).

Противовоспалительные свойства тестируемых полифенолов ХГК и НГ проявлялись снижением в печени крыс концентрации лимфоцитов в 2,06 раза ($p < 0,05$) и 2,03 раза соответственно (табл. 5). В группе ХАИ без введения препара-

Таблица 4 – Влияние хлорогеновой кислоты и нарингина на восстановление иммунологических и гематологических показателей крови крыс после длительной хронической алкогольной интоксикации в течение 24 недель и восстановительного периода

Показатель	Контроль n=7	ХАИ n=8	ХАИ+ХГК 40 мг/кг, n=8	ХАИ+НГ 40 мг/кг, n=7
НСТ, %	14,67±9,55	43,86±15,54 ^a	27,29±5,62 ^b	14,63±12,87 ^b
CH50	66,80 [66,80:66,80]	54,28 [50,10:62,63] ^a	58,45 [58,45:66,80]	66,80 [62,63:66,80]
Палочкоядерные нейтрофилы, %	1,00 [1,00:2,00]	3,00 [2,00:5,00] ^a	1,50 [0,50:4,00]	2,00 [2,00:3,00]
Сегментоядерные нейтрофилы, %	17,00 [14,00:20,00]	24,00 [16,00:28,50]	24,00 [18,50:29,50]	22,50 [20,00:28,50]
Эозинофилы, %	2,43±0,79	3,88±1,55	2,75±0,89	1,33±1,51 ^b
Моноциты, %	6,00 [5,00:7,00]	6,00 [4,50:9,50]	7,50 [6,00:9,50]	7,00 [5,00:9,00]
Лимфоциты, %	72,50 [70,00:79,00]	61,50 [55,50:66,00] ^a	66,00 [57,00:69,00] ^c	66,00 [65,00:71,00]

Примечание: ^a – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ^b – $p < 0,05$ по сравнению с ХАИ; ^c – $0,05 < p < 0,1$ по сравнению с ХАИ

Таблица 5 – Влияние хлорогеновой кислоты и нарингина на концентрацию лимфоцитов в печени крыс в восстановительный период после хронической алкогольной интоксикации в течение 24 недель, (тыс. кл/мкл)

Контроль n=8	ХАИ n=6	ХАИ+ХГК 40 мг/кг, n=6	ХАИ+НГ 40 мг/кг, n=6
10,88 [8,38:13,75]	28,63 [19,75:37,00] ^a	13,88 [10,00:16,75] ^c	14,13 [11,25:16,50]

Примечание: ^a – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ^c – $0,05 < p < 0,1$ по сравнению с ХАИ

тов данный показатель был повышен в 2,63 раза ($0,05 < p < 0,1$) по сравнению с контролем.

Сравнение эффектов растительных полифенолов, вводимых в одинаковой дозе, на фоне употребления этанола и в восстановительный период после его отмены свидетельствует о том, что ХГК обладает более выраженными противовоспалительными свойствами. ХГК более чем в 2 раза, по сравнению с НГ, снижает концентрацию лимфоцитов в печени крыс на фоне употребления этанола (ХГК – на 43,2%, НГ – 20,3% – табл. 3). Различий в эффектах полифенолов в восстановительный период, не выявлено (табл. 5).

Противовоспалительная активность полифенолов оценивалась также по изменению в крови уровня ФНО-1α и активности МПО (табл. 6). Показано, что в восстановительный период, после отмены этанола (модель № 1), активность МПО, повышенная в группе ХАИ на 25,72 %, снизилась в 1,49 раза ($p = 0,0005$) при введении ХГК и в 1,25 раза при введении НГ, что указывает на более высокие противовоспалительные

свойства ХГК. На фоне введения этанола (модель № 2) влияние полифенолов на активность МПО менее значимо.

Концентрация в сыворотке крови ФНО-1α в группах ХАИ достоверно не отличалась от значений контрольных групп, как в восстановительный период, так и на фоне употребления этанола. Можно отметить снижение уровня ФНО-1α при введении композиции ХГК+НГ на фоне употребления этанола на 26,0% (соответственно, $51,00 \pm 22,29$ нг/л – ХГК+НГ; $68,92 \pm 23,56$ нг/л – ХАИ, табл. 6).

Исследование гистологических препаратов ткани печени крыс показало увеличение количества очагов лейкоцитарной инфильтрации при ХАИ, (рис. 2, 3). Введение ХГК и НГ снижало степень воспаления в паренхиме печени, в большей степени это проявлялось под действием ХГК на фоне отмены этанола (синие столбики), (рис. 2а) – снижение в 1,69 раза. На фоне введения этанола (фиолетовые столбики) эффекты ХГК, НГ и композиции практически одинаковые – снижение

Таблица 6 – Влияние хлорогеновой кислоты, нарингина и композиции ХГК+НГ на концентрацию ФНО-1 α , активность миелопероксидазы в сыворотке крови крыс при хронической алкогольной интоксикации

Показатель	Контроль n=8	ХАИ n=7	ХАИ+ХГК 40 мг/кг n=8	ХАИ+НГ 40 мг/кг n=8	ХАИ+ХГК+ НГ (40+20) мг/ кг, n=7
Показатели при ХАИ на фоне употребления этанола					
ФНО-1 α , нг/л	71,55 $\pm$ 21,06	68,92 $\pm$ 23,56	62,12 $\pm$ 24,76	54,32 $\pm$ 39,88	51,00 $\pm$ 22,29
МПО, мкмоль ТМВ/ мин/мл сыв.	55,02 $\pm$ 10,87	72,99 $\pm$ 16,38 ^a	63,78 $\pm$ 8,05	58,56 $\pm$ 7,83	58,88 $\pm$ 15,38
Показатели при ХАИ в восстановительный период после отмены этанола					
ФНО-1 α , нг/л	39,11 $\pm$ 15,96	32,29 $\pm$ 19,38	41,64 $\pm$ 16,61	41,42 $\pm$ 17,08	–
МПО, мкмоль ТМВ/ мин/мл сыв.	61,18 $\pm$ 13,60	76,92 $\pm$ 14,00 ^a	51,55 $\pm$ 7,55 ^b	61,31 $\pm$ 9,65 ^c	–

Примечание: ^a – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ^b – $p < 0,05$ по сравнению с ХАИ; ^c – $0,05 < p < 0,1$ по сравнению с ХАИ

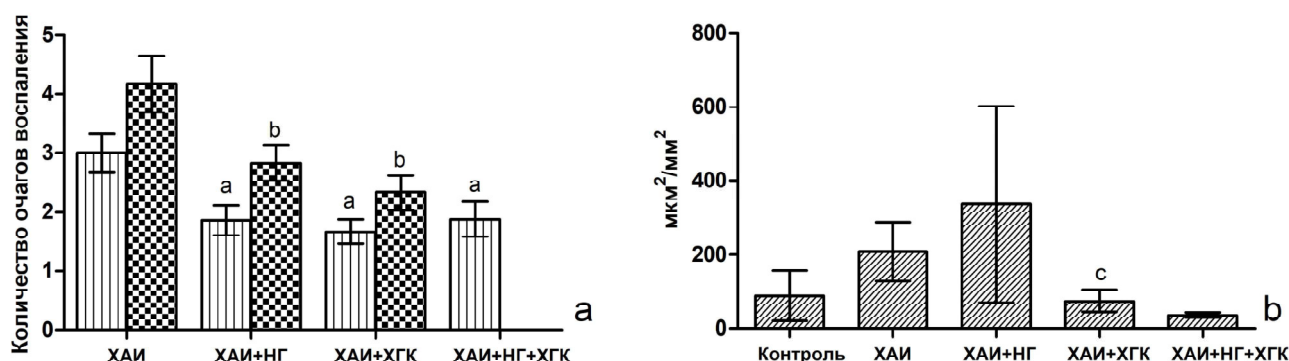


Рисунок 2 – а – Влияние хлорогеновой кислоты и нарингина на количество очагов воспаления в ткани печени крыс при хронической алкогольной интоксикации (штриховка – вертикальные линии) и в восстановительный период (штриховка – клетка, n=6); б – Площадь очагов лейкоцитарной инфильтрации в сердце, $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ среза сердца (n=6); ^a – $p < 0,05$ по сравнению с ХАИ; ^b – $p < 0,05$ по сравнению с ХАИ в восстановительный период; ^c – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

в 1,6-1,8 раза (рис. 2а). Введение ХГК снижало площадь очагов воспаления в сердце в 2,79 раза, введение композиции было более эффективным (снижение в 5,83 раза, рис. 2-б, 3); у НГ эффекты отсутствовали. Представленные данные отражают противовоспалительные свойства композиции ХГК+НГ в сердце, а также различия в механизмах противовоспалительного действия ХГК и НГ при ХАИ, которые разнонаправленно проявляются в сердце крыс, но однонаправленно в печени.

Исследования *in vitro*. Для выяснения механизмов иммуномодулирующих свойств исследуемых полифенолов были проведены исследования на культивируемых нейтрофилах крови крыс. На рисунке 4а–д представлены результаты исследований влияния 4-х композиций ХГК+НГ (табл. 1) *in vitro* на фагоцитарную активность нейтро-

филов с высоким и низким ФИ. При сниженной фагоцитарной функции клеток, композиции ХГК+НГ повышали ФИ на 26,8-52,8% ($p < 0,05$) (рис. 4а). Наилучший иммуномодулирующий эффект обнаружен у композиции 2, где концентрация ХГК в 2 раза превышала концентрацию НГ (2:1); композиция 4 не влияла на ФИ. При высокой фагоцитарной активности клеток (контроль ФИ – 78,00 $\pm$ 3,67%) эффекты композиций были незначительными (рис. 4б).

Сравнение иммуномодулирующей активности ХГК и НГ с ресвератролом (рис. 4с) показало, что ХГК (0,001 мг/мл) и НГ (0,0001 мг/мл) повышали ФИ нейтрофилов в 1,4 раза, композиция ХГК+НГ – в 1,95 раза ($p < 0,05$), ресвератрол (0,001 мг/кг) – в 2,39 раза ($p < 0,05$), что подтверждает хорошие иммуномодулирующие свойства тестируемых полифенолов *in vitro*. В НСТ-тесте,

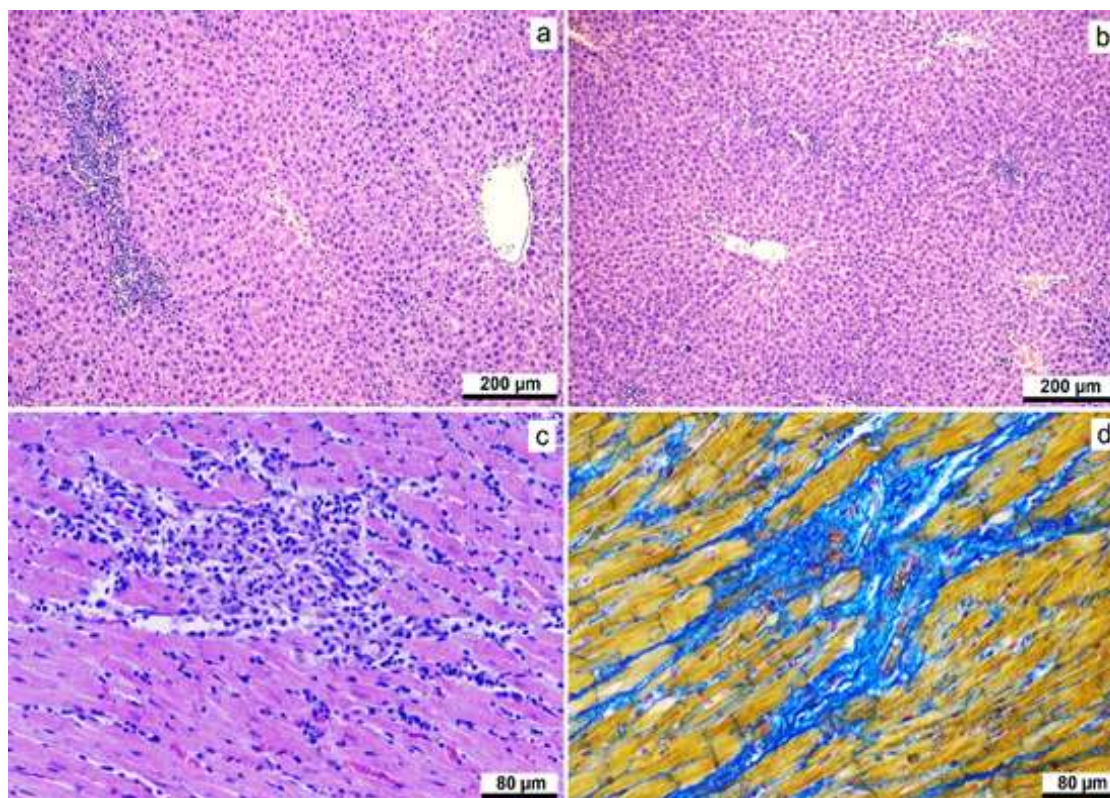


Рисунок 3 – Гистологические препараты печени (а, б) и сердца (с, d) крыс при хронической алкогольной интоксикации: наличие выраженной (а) и незначительной (б) лимфоцитарной инфильтрации с примесью сегментоядерных лейкоцитов в области портального тракта печени; Окраска гематоксилином и эозином.

Очаг лимфогистиоцитарной инфильтрации в сердце (с); Окраска гематоксилином и эозином.
Участки фиброза сердца (d) (окраска по Маллори, коллагеновые волокна – синее окрашивание)

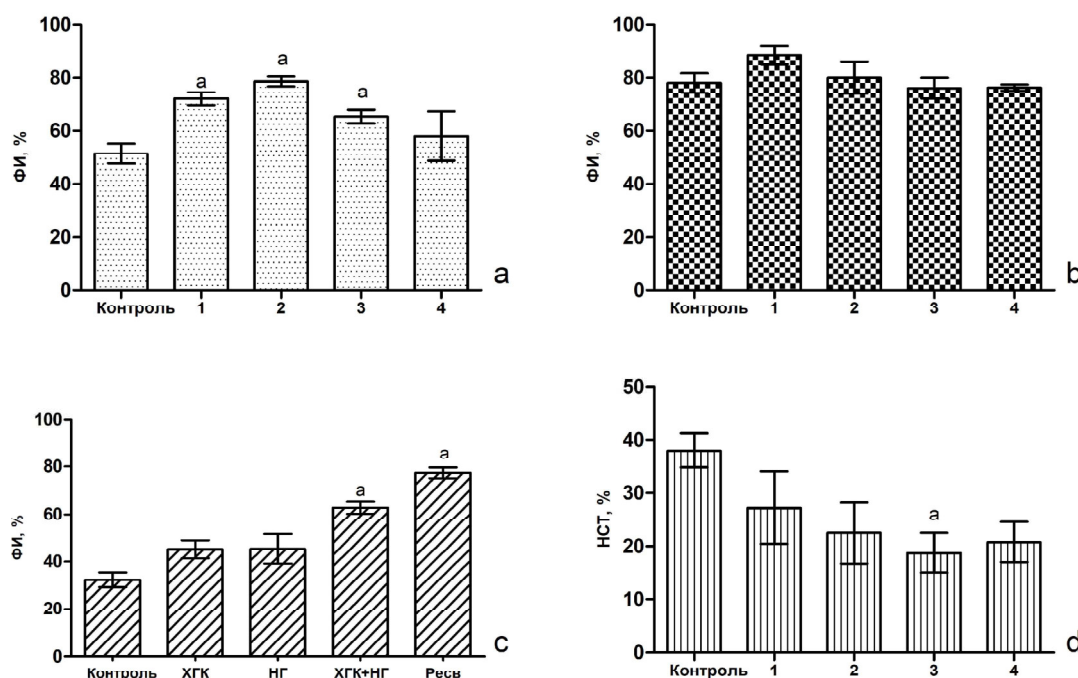


Рисунок 4 – Влияние композиций хлорогеновой кислоты и нарингина (№ 1, 2, 3, 4, табл. 1) на фагоцитарную активность нейтрофилов (ФИ %) *in vitro* в условиях сниженных (а) и нормальных (б) значений ФИ в контроле; по сравнению с ресвератролом (с); на метаболическую активность нейтрофилов в НСТ тесте (d), (n=4);

^a – $p < 0,05$ – по сравнению с контролем; Ресв – ресвератрол

при повышенном количестве формазан-положительных клеток, композиция ХГК+НГ нормализовала метаболическую активность нейтрофилов (композиции 1, 2), а при высоком содержании НГ (композиции 3, 4) – снижала (рис. 4d). Эти результаты могут свидетельствовать о способности ХГК, НГ и композиции ХГК+НГ восстанавливать исходно сниженную фагоцитарную активность нейтрофилов, а также модулировать метаболическую активность клеток при непосредственном воздействии на них полифенолов в процессе культивирования в течение 60 минут.

Результаты проведенного экспериментального исследования согласуются с данными других авторов о противовоспалительных свойствах ХГК и НГ, которые показаны при моделировании пневмонии у крыс [12], алкогольного стеатоза печени [13] и других заболеваний [14], но иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства ХГК, а также её композиций с НГ при ХАИ, показаны впервые.

Предполагаем, что выявленные при ХАИ выраженные противовоспалительные и иммуномодулирующие эффекты ХГК и НГ можно объяснить ранее установленными для данных полифенолов механизмами, которые включают: замедление синтеза и секреции медиаторов воспаления TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, NO и PGE2; модуляцию ключевых сигнальных путей, включая NF- κ B, MAPK, Nrf2 и др. [15, 16]. Специфические нарушения, индуцируемые этанолом при ХАИ, могут определять особенности в механизмах проявления защитных свойств ХГК и НГ, которые еще предстоит выяснить в дальнейших исследованиях.

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках задания 4.1.5 ГПНИ «Трансляционная медицина», подпрограмма «Экспериментальная медицина», 2021-2025 гг.

The sources of funding. The study was performed as a part of the program 4.1.5 State Scientific Research Programs “Translational Medicine”, subprogram “Experimental Medicine”, 2021-2025.

Заключение

В исследованиях, проведенных *in vivo* и *in vitro*, установлено, что ХГК и НГ, а также их композиция (2:1) обладают выраженными стимулирующими свойствами в отношении фагоцитарной активности нейтрофилов. Механизмы

иммуномодулирующей активности исследуемых полифенолов (ХГК и НГ) при ХАИ проявляются восстановлением функциональной активности нейтрофилов и коррекцией их метаболической активности. ХГК обладает более выраженными противовоспалительными свойствами, чем НГ при ХАИ. Композиция ХГК+НГ более эффективно нормализует площадь очагов воспаления в печени и сердце, снижает активность МПО и концентрацию ФНО-1 α в сыворотке крови.

Выявленные свойства важны для применения ХГК, НГ, а также композиции ХГК и НГ в качестве иммуномодулирующих и противовоспалительных средств при алкоголь-ассоциированной патологии. Представляется эффективным применение композиции полифенолов при вторичных иммунодефицитных состояниях и воспалительных процессах в организме.

Литература

1. Fernández-Solà, J. The Effects of Ethanol on the Heart: Alcoholic Cardiomyopathy / J. Fernández-Solà // *Nutrients*. 2020 Feb. Vol. 12, № 2. P. 572. DOI: 10.3390/nu12020572
2. Figueredo, V. M. Detrimental Effects of Alcohol on the Heart: Hypertension and Cardiomyopathy / V. M. Figueredo, A. Patel // *Reviews in cardiovascular medicine*. 2023. Vol. 24, № 10. P. 292. DOI: 10.31083/j.rcm2410292
3. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research / M. Naveed, V. Hejazi, M. Abbas [et al.] // *Biomédecine & pharmacothérapie*. 2018 Jan. Vol. 97. P. 67–74. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.10.064
4. Chlorogenic acid prevents acute myocardial infarction in rats by reducing inflammatory damage and oxidative stress / D. Wang, L. Tian, H. Lv [et al.] // *Biomédecine & pharmacothérapie*. 2020 Dec. Vol. 132. Art. 110773. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110773
5. Cardioprotective effect of naringin against the ischemia/reperfusion injury of aged rats / D. Shackebaei, M. Hesari, S. Ramezani-Aliakbari [et al.] // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2024. Vol. 397. P. 1209–1218. DOI: 10.1007/s00210-023-02692-2
6. Механизмы нарушения иммунного статуса при хронической интоксикации этанолом / П. Ф. Забродский, В. Г. Лим, В. А. Гришин, А. В. Кузьмин // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2011. Т. 152, № 7. С. 97–100.
7. Алкогольная кардиомиопатия: трансляционная модель / С. А. Крыжановский, Л. Г. Колик, И. Б. Цорин [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017. Т. 163, № 5. С. 582–586.
8. Новиков, Д. К. Оценка иммунного статуса / Д. К. Новиков, В. И. Новикова. Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2009. 282 с.
9. Bozeman, P. M. Inhibition of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase by dapsone / P. M. Bozeman, D. B. Learn, E. L. Thomas // *Biochemical pharmacology*. 1992 Aug. Vol. 44, № 3. P. 553–563. DOI: 10.1016/0006-2952(92)90449-s

10. Коржевский, Д. Э. Основы гистологической техники / Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров. Санкт-Петербург : СпецЛит, 2010. 95 с.
11. Immunologia / pod red. M. Jakobisiaka. Warszawa : PWN, 1995. 695 s.
12. Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid in Klebsiella pneumoniae-induced pneumonia by inactivating the p38MAPK pathway / Y. Zhang, C. Zhu, H. Zhao [et al.] // International journal of medical microbiology. 2023 Mar. Vol. 313, № 2. Art. 151576. DOI: 10.1016/j.ijmm.2023.151576
13. Chlorogenic Acid Protects against Advanced Alcoholic Steatohepatitis in Rats via Modulation of Redox Homeostasis, Inflammation, and Lipogenesis / V. Buko, I. Zavodnik, G. Budryn [et al.] // Nutrients. 2021 Nov. Vol. 13, № 11. Art. 4155. DOI: 10.3390/nu13114155
14. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols / N. Yahfoufi, N. Alsadi, M. Jambi, C. Matar // Nutrients. 2018 Nov. Vol. 10, № 11. Art. 1618. DOI: 10.3390/nu10111618
15. Chlorogenic acid: a review on its mechanisms of anti-inflammation, disease treatment, and related delivery systems / J. Huang, M. Xie, L. He [et al.] // Frontiers in pharmacology. 2023 Sep. Vol. 14. Art. 1218015. DOI: 10.3389/fphar.2023.1218015
16. Chlorogenic Acid Alleviates LPS-Induced Inflammation and Oxidative Stress by Modulating CD36/AMPK/PGC-1 α in RAW264.7 Macrophages / T. Gu, Z. Zhang, J. Liu [et al.] // International journal of molecular sciences. 2023 Aug. Vol. 24, № 17. Art. 13516. DOI: 10.3390/ijms241713516

Поступила 30.12.2024 г.

Принята в печать 14.04.2025 г.

References

1. Fernández-Solà J. The Effects of Ethanol on the Heart: Alcoholic Cardiomyopathy. Nutrients. 2020 Feb 22;12(2):572. doi: 10.3390/nu12020572
2. Figueredo VM, Patel A. Detrimental Effects of Alcohol on the Heart: Hypertension and Cardiomyopathy. Reviews in Cardiovascular Medicine. 2023;24(1):292. doi: 10.31083/j.rcm2410292
3. Naveed M, Hejazi V, Abbas M, Ali Kamboh A, Khan GJ, Shumzaid M, et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. Biomédécine & Pharmacothérapie. 2018 Jan;97:67-74. doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.064
4. Wang D, Tian L, Lv H, Z. Pang, D. Li, Z. Yao, et al. Chlorogenic acid prevents acute myocardial infarction in rats by reducing inflammatory damage and oxidative stress. Biomédécine & Pharmacothérapie. 2020 Dec;132:110773. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110773
5. Shackebaei D, Hesari M, Ramezani-Aliakbari S, M. Pashaei, F. Yarmohammadi, F. Ramezani-Aliakbari. Cardioprotective effect of naringin against the ischemia/reperfusion injury of aged rats. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2024;397:1209-1218. doi: 10.1007/s00210-023-02692-2
6. Zabrodskiy PF, Lim VG, Grishin VA, Kuzmin AV. Mechanisms of immune status disorders in chronic ethanol intoxication. Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny. 2011;152(7):97-100. (In Russ.)
7. Kryzhanovskiy SA, Kolik LG, Tsorin IB, Stolyaruk VN, Vititnova MB, Ionova EO, i dr. Alcoholic cardiomyopathy: a translational model. Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny. 2017;163(5):582-586. (In Russ.)
8. Novikov DK, Novikova VI. Assessment of immune status. Moscow, RF: GEOTAR-Media; 2009. 282 p.
9. Bozeman PM, Learn DB, Thomas EL. Inhibition of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase by dapsone. Biochemical Pharmacology. 1992 Aug;44(3):553-63. doi: 10.1016/0006-2952(92)90449-s
10. Korzhevskiy DE, Gilyarov AV. Fundamentals of histologic technique. Sankt-PeterburgRF: SpetsLit; 2010. 95 p. (In Russ.)
11. Jakobisiaka M, red. Immunologia. Warszawa: PWN; 1995. 695 s.
12. Zhang Y, Zhu C, Zhao H, Z. Sun, X. Wang. Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid in Klebsiella pneumoniae-induced pneumonia by inactivating the p38MAPK pathway. International Journal of Medical Microbiology. 2023 Mar;313(2):151576. doi: 10.1016/j.ijmm.2023.151576
13. Buko V, Zavodnik I, Budryn G, M. Zakłós-Szyda, E. Belonovskaya, S. Kirko. Chlorogenic Acid Protects against Advanced Alcoholic Steatohepatitis in Rats via Modulation of Redox Homeostasis, Inflammation, and Lipogenesis. Nutrients. 2021 Nov;13(11):4155. doi: 10.3390/nu13114155
14. Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar C. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. Nutrients. 2018 Nov;10(11):1618. doi: 10.3390/nu10111618
15. Huang J, Xie M, He L, Song X, T. Cao. Chlorogenic acid: a review on its mechanisms of anti-inflammation, disease treatment, and related delivery systems. Frontiers in Pharmacology. 2023 Sep;14:1218015. doi: 10.3389/fphar.2023.1218015
16. Gu T, Zhang Z, Liu J, L. Chen, Y. Tian, W. Xu, et al. Chlorogenic Acid Alleviates LPS-Induced Inflammation and Oxidative Stress by Modulating CD36/AMPK/PGC-1 α in RAW264.7 Macrophages. International Journal of Molecular Sciences. 2023 Aug;24(17):13516. doi: 10.3390/ijms241713516

Submitted 30.12.2024

Accepted 14.04.2025

Сведения об авторах:

В.Л. Мороз – старший научный сотрудник, Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси», <https://orcid.org/0009-0001-3914-6985>;

Е.Б. Белоновская – старший научный сотрудник, Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси», <https://orcid.org/0000-0002-8354-4606>;

А.В. Романчук – научный сотрудник, Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси», <https://orcid.org/0000-0003-0318-352X>;

И.А. Кузьмицкая – старший научный сотрудник, Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси», <https://orcid.org/0009-0001-6362-5679>;

В.Ч. Полубок – научный сотрудник, Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси», <https://orcid.org/0000-0002-9418-7069>;

Т.А. Бородина – научный сотрудник, Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси», <https://orcid.org/0009-0004-9607-7471>;

А.А. Островский – д.м.н., профессор, <https://orcid.org/0000-0001-8647-3922>;

А.Г. Шляхтун – зав. отраслевой лабораторией, Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси», <https://orcid.org/0000-0002-7618-9589>;

Надольник Лилия Ивановна – д.б.н., доцент, зав. отделом доклинического и экспериментального исследования, Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси», <https://orcid.org/0000-0002-0363-7969>, e-mail: lnadolnik@gmail.com.

Information about authors:

V.L. Moroz – Senior Researcher, Republican Research Unitary Enterprise “Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus”, <https://orcid.org/0009-0001-3914-6985>;

E.B. Belonovskaya – Senior Researcher, Republican Research Unitary Enterprise “Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus”, <https://orcid.org/0000-0002-8354-4606>;

A.V. Romanchuk – Researcher, Republican Research Unitary Enterprise “Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus”, <https://orcid.org/0000-0003-0318-352X>;

I.A. Kuzmitskaya – Senior Researcher, Republican Research Unitary Enterprise “Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus”, <https://orcid.org/0009-0001-6362-5679>;

V.Ch. Polubok – Researcher, Republican Research Unitary Enterprise “Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus”, <https://orcid.org/0000-0002-9418-7069>;

T.A. Borodina – Researcher, Republican Research Unitary Enterprise “Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus”, <https://orcid.org/0009-0004-9607-7471>;

A.A. Astrowski – Doctor of Medical Sciences, professor, <https://orcid.org/0000-0001-8647-3922>;

A.H. Shlyachtun, – Head of the Industry Laboratory, Republican Research Unitary Enterprise “Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus”, <https://orcid.org/0000-0002-7618-9589>;

Liliya I. Nadolnik – Doctor of Biological Sciences, associate professor, head of the Department of Preclinical and Experimental Research, Republican Research Unitary Enterprise “Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus”, <https://orcid.org/0000-0002-0363-7969>, e-mail: lnadolnik@gmail.com.