

УДК [612.017.1+612-06/615.37]:618.11-007.87

*В.В.Козар, М.Я.Кудря, Н.В.Устенко, Т.О.Павленко, М.В.Жураковська*

## СТАН ГУМОРАЛЬНОЇ ЛАНКИ ІМУНІТЕТУ ЗА УМОВ МЕТАБОЛІЧНОГО СИНДРОМУ НА ТЛІ ГІПОЕСТРОГЕНІЇ ТА ЙОГО ФАРМАКОЛОГІЧНА КОРЕКЦІЯ

Відділ фармакології та токсикології (зав. – д.біол.н. Н.Г.Горбенко)  
ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я.Данилевського, АМН України», м. Харків

**Резюме.** Наведені результати власних досліджень щодо зміни деяких показників гуморальної ланки імунітету на моделі експериментального метаболічного синдрому за умов дефіциту естрогенів. Показаний імунотропний ефект левамізолу та його похідного

ПЛ-308 на досліджені показники в оварієктомованих щурів з метаболічним синдромом.

**Ключові слова:** гуморальний імунітет, метаболічний синдром, дефіцит естрогенів, імуномодулятори.

**Вступ.** Менопауза є фізіологічним процесом, проте гормональні перебудови, які проходять на тлі дефіциту естрогенів, нерідко супроводжуються погіршенням здоров'я жінки і впливають не лише на якість, але й на тривалість її життя. Зміни метаболічного характеру, які проявляються певною патологічною симптоматикою (розвитком абдомінального ожиріння, інсулінорезистентності, порушенням ліпідного, вуглеводного обміну тощо), дали підставу в 1997 році С. Spencer і співавт. сформулювати концепцію постменопаузального метаболічного синдрому. На сьогодні менопауза визнана незалежним предиктором компонентів метаболічного синдрому і чинником ризику серцево-судинної патології, в основі яких лежить дефіцит естрогенів [6].

Гіпоестрогенія в поєднанні з гіперінсулінемією та абдомінальним ожирінням – основними складовими метаболічного синдрому – підвищують ризик розвитку нейродегенеративних процесів, раку молочної залози, колоректального раку і в меншій мірі – яєчників у жінок у період менопаузи [9, 11].

Інсулінорезистентність корелює зі змінами цитокінового балансу в жировій тканині в бік посилення прозапальної дії, зростанням рівня гострофазових білків тощо. Не викликає сумніву внесок імунної системи в розвиток атеросклерозу, нейродегенеративних процесів та пухлин, важливу роль в яких відіграє порушення балансу Th1- / Th2 – та активності Treg- лімфоцитів [5].

У період менопаузи, зважаючи на тісні відносини між основними регуляторними системами – нервовою, ендокринною та імунною, дефіцит естрогенів посилює дисбаланс основних функціональних систем імунітету, що супроводжується зміною імунного гомеостазу і підтверджується збільшенням захворюваності жінок не лише на серцево-судинну, онкологічну, хронічну запальну, а й на автоімунну патологію [3]. Відомо, що естрогени чинять виразний вплив на стан гуморального імунітету в жінок, тому в умовах гіпоестрогенії спостерігається посилення активації даної ланки імунітету і, як наслідок, зростання рівня автоантитіл і автоімунних захворювань у період менопаузи [12].

Отже, зміни, які проходять на тлі перебудови гормонального балансу, зумовлюють рівень імуні-

нологічних реакцій і здебільшого сприяють послабленню сили імунологічних функцій, значному обмеженню можливостей імунної системи і розвитку вторинної імунної недостатності. [7]. Подальше вивчення взаємовідносин між гормональним статусом та функцією імунної системи може забезпечити розуміння патогенетичних механізмів порушень імунного гомеостазу в умовах дефіциту естрогенів та нових напрямків для їх корекції, а зважаючи на роль запалення в механізмах атерогенезу та інсулінорезистентності, можливо і зменшення проявів метаболічного синдрому.

Тому на сьогодні важливим завданням залишається пошук ефективних та безпечних лікарських засобів, які проявляють імуотропну активність. У лабораторії синтезу гормоноподібних сполук ДУ «ІПЕП ім. В.Я.Данилевського АМН України» (м. Харків) синтезовано сполуку – похідне левамізолу ПЛ-308. Дана сполука менш токсична порівняно з левамизолом (5 -й клас практично нетоксичні сполуки).

**Мета дослідження.** Оцінити вплив левамізолу та його похідного ПЛ-308 на деякі показники гуморального імунітету в оварієктомованих щурів на тлі метаболічного синдрому.

**Матеріал і методи.** Досліди проведено на білих щурах – самках. Гіпоестрогенію відтворювали шляхом двобічної оварієктомії під легким ефірним наркозом. Через два тижні після оварієктомії тварин брали в експеримент. Модель метаболічного синдрому в оварієктомованих щурів індукували хронічним введенням сахарози (30 % розчин з питною водою). Сформовано п'ять груп тварин: 1-а група – інтактний контроль; 2-а група – оварієктомовані щури (контроль оварієктомії); 3-я група – оварієктомовані щури, які отримували 30 % розчин сахарози (контроль метаболічного синдрому на тлі гіпоестрогенії); 4-а група – оварієктомовані щури, які отримували 30 % розчин сахарози та імуномодулюючий препарат левамизол у дозі 2,5 мг/кг маси тіла перорально; 5-а група – оварієктомовані щури, які отримували 30 % розчин сахарози та ПЛ-308 у дозі 4,0 мг/кг маси тіла перорально. Сполуки вводили впродовж п'яти тижнів за такою схемою: перші три дні тварини отримували досліджувані сполуки, наступні чотири дні – перерва.

Метаболічний синдром у тварин верифіковано за даними внутрішньоочередового тесту толерантності до глюкози (підвищення площі під глікемічною кривою), зростання маси тіла та тригліцеридемії у групі щурів, які отримували 30 % розчин сахарози, щодо інтактних тварин.

Вивчення стану гуморальної ланки імунітету проводили шляхом дослідження титру гемолізину та гетерофільних аглютининів у реакції аглютинації, цитотоксичних властивостей сироватки крові лімфоцитотоксичним тестом [2], антитіл до трьох типів ДНК (нативної, денатурованої, формалінізованої) та рівня ендотоксину методом імуоферментного аналізу на аналізаторі «Stat Fax 2100» (USA).

Утримання та маніпуляції з тваринами проводили згідно з положенням «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2001).

Виведення тварин з експерименту проводили шляхом декапітації під ефірним наркозом.

Статистичний аналіз даних проводили із визначенням середнього арифметичного ( $\bar{X}$ ) та його статистичної похибки ( $S_x$ ) для груп із нормальним розподілом. Для аналізу відмінностей використовували критерій Ньюмена-Каусла. Оцінку «нульових» гіпотез здійснювали на рівні значущості не більше 0,05.

#### Результати дослідження та їх обговорення.

Дослідження впливу гіпоестрогенії як такої та на тлі метаболічного синдрому на зміни рівня природних антитіл гемолізину і гетерофільних аглютининів, які є показником ступеня імунологічної зрілості організму та нормального функціонування імунної системи, а також за умов уведення сполук з імуномодулювальними властивостями показали, що досліджені показники в жодній з піддослідних груп статистично не відрізнялися від значень інтактних тварин ( $p > 0,05$ ). Тобто, за вказаний період спостереження досліджена ланка неспецифічного гуморального імунітету не зазнала значних змін.

Дослідження цитотоксичних властивостей сироваток крові встановило (табл. 1), що в крові оварієктомованих щурів спостерігали підвищення цитотоксичності майже в 3 рази порівняно з інтактним контролем ( $p < 0,05$ ), а в групі контролю оварієктомія + 30 % сахароза він був вищим не лише щодо групи інтактних, але і оварієкто-

мованих щурів, які утримувалися на стандартному раціоні віварію (відповідно в 6,3 та 2,0 рази,  $p < 0,05$ ). Отже, оварієктомія, яка супроводжується додатковим вуглеводним навантаженням, чинить більш виражений вплив на цитотоксичні властивості сироватки крові.

Уведення сполук з імуномодулювальними властивостями чинило позитивний вплив на цитотоксичність (табл. 1). На тлі прийому левамізолу показник цитотоксичності зменшувався майже в 3 рази щодо тварин групи контролю оварієктомія + 30 % сахароза ( $p < 0,05$ ), а за умов уведення ПЛ-308 – у 8 разів ( $p < 0,05$ ). Слід відзначити також, що в групі тварин, які отримували левамізол, показник цитотоксичності сироваток залишався підвищеним у 2 рази порівняно з інтактним контролем ( $p < 0,05$ ), тоді як уведення ПЛ-308 знижувало його як по відношенню до інтактних тварин (майже в 1,3 рази,  $p < 0,05$ ), так і групи щурів, яким вводили левамізол (майже 2,7 рази,  $p < 0,05$ ).

Відомо, що цитотоксичні реакції можуть бути опосередковані клітинними чи антитільними механізмами. Їх підвищення спостерігають при наявності авто- та ізоімунних антитіл, реакції «трансплантат проти господаря» тощо. У той же час, зниження цього показника може свідчити про розвиток імунодефіцитного стану в організмі. Підвищення цитотоксичності сироваток за умов гіпоестрогенії як такої та, особливо, поєднано з метаболічним синдромом може вказувати на дисбаланс імунологічних функцій та свідчити про можливість підвищення рівня автоантитіл уже на початкових етапах естрогендефіцитного стану. Зниження цитотоксичності під впливом імуномодулювальних сполук свідчить про доцільність застосування імунокорекції в період менопаузи для зменшення ризику аутоімунної патології.

Ряд патологічних процесів супроводжуються метаболічними порушеннями, в основі яких лежить накопичення в організмі в нефізіологічних концентраціях різних проміжних і кінцевих продуктів обміну речовин (молекул середньої маси, продуктів перекисного окиснення ліпідів, посилення транслокації ендотоксинів і мікрофлори з кишечника в кров, що призводить до підвищення в крові концентрації ліпополісахаридів (ЛПС) грамнегативних мікроорганізмів та ін.). Їх пов'я-

Таблиця 1

#### Показники рівня антитіл до ендотоксину та цитотоксичності сироваток крові в оварієктомованих щурів за умов метаболічного синдрому ( $\bar{X} \pm S_x$ ), $n=5 \div 6$

Група тварин	Антитіла до ендотоксину, УО/мл	Цитотоксичність сироваток, %
Контроль інтактний	1,10±0,04	3,2±0,58
Контроль оварієктомії	3,96±0,35 <sup>1)</sup>	9,8±0,8 <sup>1)</sup>
Контроль оварієкт. + сахароза	3,64±0,27 <sup>1)</sup>	20,0±1,4 <sup>1) 2)</sup>
Левамізол	0,88±0,12 <sup>2) 3)</sup>	6,7±0,8 <sup>1) 2) 3)</sup>
ПЛ-308	0,98±0,09 <sup>2) 3)</sup>	2,5±0,5 <sup>2) 3) 4)</sup>

Примітки. <sup>1)</sup> Вірогідне щодо інтактного контролю ( $p < 0,05$ ); <sup>2)</sup> Вірогідне щодо контролю оварієктомії ( $p < 0,05$ ); <sup>3)</sup> Вірогідне щодо контролю оварієктомія + 30% сахароза ( $p < 0,05$ ); <sup>4)</sup> Вірогідне щодо левамізолу ( $p < 0,05$ )

Таблиця 2

**Рівень антитіл до різних типів ДНК у оварієктомованих щурів  
за умов метаболічного синдрому ( $X \pm Sx$ ),  $n=5 \div 6$**

Група тварин	ДНК нативна, у.о.	ДНК денатур., у.о.	ДНК формал., у.о.
Контроль інтактний	64,2±7,3	78,6±7,2	102,6±10,6
Контроль оварієктомії	69,0±18,4	97,2±17,8	85,2±12,5
Контроль оварієк. + 30% сахароза	45,6±4,5	113,4±12,3	70,2±11,0 <sup>*1)</sup>
Левамізол	91,5±14,3 <sup>3)</sup>	89,3±3,3 <sup>3)</sup>	111,0±11,0 <sup>3)</sup>
ПЛ-308	50,5±5,6 <sup>4)</sup>	56,0±7,2 <sup>2)3)4)</sup>	69,0±4,8 <sup>*1)4)</sup>

Примітки. <sup>3)</sup> Вірогідне щодо контролю оварієктомія + 30% сахароза ( $p < 0,05$ ); <sup>4)</sup> Вірогідне щодо групи, яка отримувала левамизол ( $p < 0,05$ ); <sup>2)</sup> Вірогідне щодо контролю оварієктомії  $K_2$  ( $p < 0,05$ ); <sup>\*1)</sup> Зміни у вигляді тенденції щодо інтактного контролю ( $0,05 < p < 0,1$ )

зують із синдромом ендогенної інтоксикації (СЕІ), рівень якої визначають біохімічним (рівень середніх молекул), морфологічним (лейкоцитарний індекс інтоксикації) чи імунологічним (визначення ендотоксину, визначення антитіл до ендотоксину) методами.

Встановлено, що в групі контролю оварієктомії та оварієктомія + 30 % сахароза рівень антитіл до ендотоксину більш ніж у 3 рази перевищував цей показник для тварин інтактного контролю ( $p < 0,05$ ) (табл. 1). Уведення сполук з імуномодулювальною активністю сприяло зменшенню більш ніж у 3 рази ( $p < 0,05$ ) рівня антитіл до ендотоксину, що практично відповідало показникам інтактних тварин.

Виявлені зміни рівня антитіл до ендотоксину, які відображають стан ендогенної інтоксикації, свідчать про те, що в умовах гіпоестрогенії та в поєднанні з вуглеводним навантаженням безпосередній вплив на цей показник чинить саме гіпоестрогенія.

Комплекс метаболічних порушень, які формуються на фоні СЕІ, призводять не лише до зменшення об'ємів органів імунної системи (інволюція тиміко-лімфатичного апарату) і посилення проникності природних бар'єрів, але й до зміни взаємодії окремих її ефektorних ланок, появи неспецифічних симптомів у вигляді різноманітних порушень функцій переважно нервової та ендокринної систем, а пізніше – приєднання симптомів специфічних системних уражень [4]. Можна припустити, що в умовах гіпоестрогенії ендотоксемія може брати участь у створенні патогенетичної основи для клінічного прояву імуносупресії і формування вторинної імунної недостатності. Нормалізація рівня антитіл до ендотоксину сполуками з імуномодулювальними властивостями свідчить про важливість включення імуномодуляторів у терапію постменопаузального метаболічного синдрому.

Одним із типів органонеспецифічних автоантитіл є антитіла до ДНК, підвищення рівня яких є маркером розвитку автоімунного процесу [9]. У даному випадку встановлена відсутність вірогідних відмінностей між контрольними групами в рівні антитіл до ДНК (табл. 2), за винятком зниження антитіл до формалінізованої ДНК у групі контроль оварієктомії + 30 % сахароза порівняно

з інтактним контролем, яке носило характер тенденції ( $0,05 < p < 0,1$ ). Таким чином, за даних умов експерименту сама оварієктомія, а також у сполученні з вуглеводним навантаженням, не спричинила значущих змін рівня антитіл до ДНК.

Уведення левамизолу викликало підвищення рівня антитіл до нативної і формалінізованої та зниження до денатурованої ДНК відносно контрольної групи оварієктомія + 30 % сахароза ( $p < 0,05$ ). Здатність левамизолу підвищувати рівень антитіл до ДНК може бути зумовлена його властивостями стимулювати міграційну активність лейкоцитів, яка супроводжується посиленням синтезу ДНК, або його схожістю з тимоміметичною дією тимусних гормонів [8].

На тлі введення ПЛ-308 зафіксовано вірогідне зниження рівня антитіл до усіх типів ДНК порівняно з левамизолом ( $p < 0,05$ ), зниження рівня антитіл до денатурованої ДНК щодо контрольних груп оварієктомованих щурів та оварієктомія + 30 % сахароза ( $p < 0,05$ ) і у вигляді тенденції до зниження антитіл до формалінізованої ДНК відносно групи інтактних тварин ( $0,05 < p < 0,1$ ).

Раніше нами встановлено, що левамизол і ПЛ-308 вірогідно знижували кількість В-лімфоцитів в умовах досліджень *in vitro*. Проте зважаючи на різну дію сполук відносно рівня антитіл до ДНК, можна припустити, що механізми їх впливу на синтез антитіл різний і це може відкрити нові перспективи застосування ПЛ-308 при патологіях, які супроводжуються автоімунною агресією. Зниження рівня антитіл до ДНК є значною перевагою ПЛ-308 над сполукою порівняння левамизолом за таких умов.

Таким чином, проведені дослідження продемонстрували наявність змін гуморальної ланки імунітету в оварієктомованих тварин на тлі метаболічного синдрому та важливості корекції ще однієї регуляторної системи – імунної в умовах дефіциту естрогенів.

#### Висновки

1. Гіпоестрогенія спричиняє підвищення цитотоксичності сироваток та рівня антитіл до ендотоксину.
2. На тлі метаболічного синдрому, індукованого високовуглеводною дією, посилюється

негативний вплив дефіциту естрогенів за рахунок збільшення цитотоксичності та появи антитіл до формалізованої ДНК.

3. Сполуки з імуномодулювальними властивостями левамизол та його похідне ПЛ-308 сприяли нормалізації показників гуморального імунітету у овариєктомованих щурів на тлі метаболічного синдрому.

4. За ефективністю впливу на стан гуморального імунітету ПЛ-308 не поступається левамизолу, а відносно деяких показників навіть переважає його, що зумовлює важливість подальшого вивчення сполуки.

Одержані дані свідчать про перспективність дослідження впливу фармакологічних засобів з імуномодулювальними властивостями на патогенетичні складові постменопаузальних метаболічних розладів.

### Література

1. Дерик О.З. Аналіз смертності та потенціально втрачених років життя жінок в пері- та постменопаузі / О.З.Дерик // Педіатрія, акушерство та гінекол. – 2006. – № 4. – С. 96-99.
2. Иммунологические методы / Под ред. Г.Фриделя. Пер. с нем. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.
3. Ackerman L.S. Sex hormones and the genesis of autoimmunity / L.S. Ackerman // Arch. Dermatol. – 2006. – Vol. 142, № 3. – P. 371-376.
4. 17 $\beta$ -estradiol and progesterone do not influence the production of cytokine from lipopolysaccharide-stimulated monocytes in humans / A.Bouman, M.Schipper, M.Heineman [et al.] // Fertil. Steril. – 2004. – Vol. 82, № 3. – P. 1212-1219.
5. Chen Z. The17 cells: a new fate for differentiating helper T cells / Z.Chen, J.O'Shea // Immunol. Res. – 2008. – Vol. 41, № 2. – P. 87-102.
6. Cho G.J. Postmenopausal status according to years since menopause as an independent risk factor for the metabolic syndrome / G.J.Cho, J.H.Lee, H.T.Park [et al.] // Menopause. – 2008. – Vol. 15, № 3. – P. 524-529.
7. Fairweather D. Sex differences in autoimmune disease from a pathological perspective / D.Fairweather, S.Frisancho-Kiss, N.Rose // Am. J. Pathol. – 2008. – Vol. 173, № 3. – P. 600-609.
8. Gonzales C. Neuroprotective effects of estrogens: cross-talk between estrogen and intracellular insulin signaling / C.Gonzales, F.Diaz, A.Alonso // Infect. Disord. Drug. Targets. – 2008. – Vol. 8, № 1. – P. 65-67.
9. Ishihara Y. Autoantibodies / Y.Ishihara // Rinsho Byori. – 2005. – Vol. 53, № 6. – P. 562-569.
10. Stürmer T. Metabolic Abnormalities and Risk for Colorectal Cancer in the Physicians' Health Study / T.Stürmer, J.Buring, I.Lee // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2006. – Vol. 15, № 12. – P. 2391-2397.
11. Zandman-Goddard G. Gender and autoimmunity / G.Zandman-Goddard, E.Peeva, Y.Shoenfeld // Autoimmun. Rev. – 2007. – Vol. 6, № 6. – P. 366-72.

## СОСТОЯНИЕ ГУМОРАЛЬНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА В УСЛОВИЯХ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА НА ФОНЕ ГИПОЭСТРОГЕНИИ И ЕГО ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ

*В.В.Козарь, М.Я.Кудря, Н.В.Устенко, Т.А.Павленко, М.В.Жураковская*

**Резюме.** Представлены результаты собственных исследований относительно изменений некоторых показателей гуморального звена иммунитета на модели экспериментального метаболіческого синдрома в условиях дефицита эстрогенов. Показан иммунокорригирующий эффект левамизола и его производного ПЛ-308 на исследованные показатели у овариэктомированных крыс с метаболіческим синдромом.

**Ключевые слова:** гуморальный иммунитет, метаболіческий синдром, дефицит эстрогенов, иммуномодуляторы.

## THE STATE OF THE HUMORAL COMPONENT OF IMMUNITY UNDER CONDITIONS OF METABOLIC SYNDROME WITH UNDERLYING HYPOESTROGENIA AND ITS FARMACOLOGICAL CORRECTION

*V.V.Kozar, M.Y.Kudria, N.V.Ustenko, T.O.Pavlenko, M.V.Zhurakovska*

**Abstract.** The results of the authors' own investigations as to a change of some indices of the humoral component on a model of experimental metabolic syndrome under the conditions of a deficit of estrogens are presented. An immune correcting effect of levamisole and its derivative PL-308 on the indices under study in ovariectomized rats with metabolic syndrome is demonstrated.

**Key words:** humoral immunity, metabolic syndrome, estrogen deficit, immunomodulators.

SI "V.Y.Danylevskiy Institute for Endocrine Pathology Problems of the Academy of Medical Sciences of Ukraine" (Kharkiv)

Рецензент – доц. В.В.Степанчук

Buk. Med. Herald. – 2009.–Vol.13, № 4.–P.141-144

Надійшла до редакції 15.08.2009 року