

© В. В. Козар

УДК 612.017.11:618.11-007.87:612.018.2

В. В. Козар

Стан гуморальної ланки аутоімунітету у оваріектомованих щурів із метаболічним синдромом

**Державна установа «Інститут проблем ендокринної патології
ім. В. Я. Данилевського НАМН України» (ДУ ІПЕП) (м. Харків)**

Дана робота є фрагментом наукової теми «Визначення біохімічних та функціональних порушень в серці за умов метаболічного синдрому на тлі гіпоестрогенії та пошук засобів для їх фармакологічної корекції (експериментальне дослідження)», № держ. реєстрації 0110U001008.

Вступ. Дефіцит естрогенів є одним із важливих чинників зниження надійності регуляції гомеостазу в період постменопаузи. Показано, що гіпоестрогенія може сприяти прогресуванню метаболічних порушень менопаузи, що знайшло віддзеркалення у введенні такого терміну, як постменопаузальний метаболічний синдром (МС). Комбінація ряду факторів ризику за наявності метаболічного синдрому (дисліпідемія, інсулінорезистентність, ендотеліальна, імунологічна дисфункція, посилення прокоагуляційного стану, гіпотиреоз тощо) є тим несприятливим фоном, який і обумовлює розвиток захворювань чи їх ускладнень у жінок в постменопаузі. Ілюстрацією цьому є зростання захворюваності жінок на серцево-судинні, онкологічні хвороби, ЦД 2 типу тощо [13].

Естрогени являються природними регуляторами імунної системи, свідченням чому є виявлення естрогенових рецепторів на імунокомпетентних клітинах [7]. За умов дефіциту естрогенів та метаболічних порушень, характерних для МС, спостерігають дисфункцію імунної системи, що підтверджується зростанням захворюваності жінок в період постменопаузи також і на аутоімунну патологію [1].

Відомо, що статевий диморфізм, який проявляється більш вираженою активністю як гуморальної, так і клітинної ланок імунітету, та більш високими рівнями циркулюючих антитіл у жінок, у порівнянні з чоловіками, свідчить про ефективніше функціонування імунної системи у жінок в репродуктивному віці [8]. Було показано, що дисфункція імунної системи та ризик аутоімунної патології мають статеву залежність. Результати епідеміологічних досліджень показали, що 80% аутоімунних захворювань реєструють саме у жінок [4]. Встановлено, що патогенетичні механізми розвитку судинної дисфункції внаслідок активації прозапального стану є характерними як для аутоімунної патології, так і атеросклерозу та МС. Даний факт може бути ще одним підтвердженням більш високого ризику серцево-судинних подій у жінок в постменопаузі [6].

Відомо, що аутоімунні реакції спостерігаються в нормі у здорових людей. В результаті цих процесів утворюється велика кількість аутоантитіл, які відносять до природних. Ці процеси відбуваються безперервно, їх дії зводяться до елімінації відмираючих, старіючих, хворих клітин, вони являються першим компонентом імунної відповіді на різні антигени. До такого типу антитіл відносять антитіла до ДНК, які направлені проти фрагментів ядерної ДНК [3], та антитіла до фосфоліпідів (серед яких основною фракцією є антитіла до кардіоліпіну), які продукуються внаслідок надходження у кровоток фосфоліпідних компонентів мембран.

У той же час, стійкі зміни в репертуарах аутоантитіл, які виникають в результаті порушення гомеостазу, свідчать про розвиток дисфункції імунної системи і посилення тяжкості загального стану та/чи перебігу захворювання [7]. В ряді досліджень представлені дані, які продемонстрували, що в період постменопаузи можуть спостерігатися значні довготривалі і специфічні кількісні зміни складу циркулюючих природних аутоантитіл, що є підґрунтям підвищення ризику аутоімунних захворювань [1]. Так, зростання рівня аутоантитіл до ДНК та кардіоліпіну асоційовані з підвищенням ризику розвитку аутоімунних процесів, артеріальним та венозним тромбозом і активацією запалення [14].

Численні експериментальні і клінічні дослідження показали, що гормонозамісна терапія може частково чи повністю відновлювати функціональну спроможність імунної системи [2]. Раніше вважали, що екзогенні естрогени здатні погіршувати перебіг аутоімунних захворювань та збільшувати ризик тромбозів. Проте, наступні дослідження продемонстрували, що гормонозамісна терапія в постменопаузі здатна покращувати чутливість клітин до інсуліну, а також мати позитивний вплив на перебіг аутоімунних захворювань, зокрема знижуючи рівень аутоантитіл [11]. На сьогодні продовжують активно вивчатися модулюючі ефекти естрогенів на імунну систему, в тому числі на стан аутоімунітету, як і роль імунної системи в порушеннях, пов'язаних з дефіцитом естрогенів.

Метою роботи було дослідити вплив МС на тлі гіпоестрогенії на рівень аутоантитіл до нативної ДНК і кардіоліпіну в плазмі крові щурів та за умов введення 17β -естрадіолу.

Об'єкт і методи дослідження. Об'єкти дослідження – 17 β -естрадіол, метаболічний синдром, дефіцит естрогенів, аутоантитіла.

Дослідження проведені на 3-місячних щурах-самцях популяції Вістар. Гіпоестрогенію відтворювали шляхом двосторонньої оварієктомії під легким ефірним наркозом. Експеримент починали через 2 тижні після хірургічного втручання. Індукцію метаболічного синдрому здійснювали шляхом хронічного (протягом двох місяців) надходження фруктози із питною водою в концентрації 200 г/л (високофруктозна дієта – ВФД) [12].

Усі експериментальні тварини були розподілені на наступні групи: «Інтактний контроль»; «Оварієктомія»; «Оварієктомія+ВФД+плацебо»; «Оварієктомія+ВФД+17 β -естрадіол».

МС у щурів було верифіковано за показниками глюкозного гомеостазу, інсулінорезистентності та масою тіла.

17 β -естрадіол вводили перорально за допомогою зонду в дозі 0,2 мг/кг маси тіла у вигляді суспензії один раз на добу, починаючи з першого дня експерименту.

Визначення рівнів антитіл до нативної ДНК та кардіоліпіну в плазмі крові проводили за допомогою розробленої нами реакції латексної аглютинації [Пат. 63006 UA, Пат. 63008 UA]. Результат оцінювали за останнім титром, в якому спостерігали аглютинацію латексних частинок.

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

Статистичний аналіз проведено із застосуванням рангового аналізу варіацій за Крускалом-Уоллісом та апостеріорним порівнянням середніх значень за допомогою критерію Дана. Результати представлені у вигляді середньої арифметичної величини (X), медіани (Me) та мінімальних і максимальних дат (min ч max). Критичний рівень значущості при перевірці статистичної гіпотези приймали на рівні 0,05.

Результати досліджень та їх обговорення.

Встановлено, що оварієктомія підвищувала рівень аутоантитіл в плазмі крові щурів і до нативної ДНК, і до кардіоліпіну порівняно з інтактними тваринами (відповідно в 2 і 3 рази, $p < 0,05$) (табл.). Отже, дефіцит естрогенів є самостійним чинником зростання титру аутоантитіл.

У оварієктомованих щурів із МС, індукованим ВФД, спостерігали вірогідне збільшення лише рівня аутоантитіл до кардіоліпіну (в 1,7 разів, $p < 0,05$) відносно оварієктомованих щурів, які утримувалися на стандартній дієті віварію ($p < 0,05$) (табл.). Отримані дані свідчать, що поєднання гіпоестрогенії з МС посилює імунологічний дисбаланс.

Введення 17 β -естрадіолу оварієктомованим щурам із МС, індукованим ВФД, сприяло достовірному зниженню рівня аутоантитіл до ДНК і кардіоліпіну в плазмі крові ($p < 0,05$). При цьому, показники рівня аналітів у щурів із МС, які утримувалися на ВФД та отримували 17 β -естрадіол, вірогідно не відрізнялися від значень інтактних тварин.

Відомо, що однією із важливих фізіологічних функцій естрогенів є інгібіція апоптотичних процесів [10]. В умовах дефіциту естрогенів порушується вказана ланка гомеостазу, внаслідок чого в кровотоці надлишок фосфоліпідних компонентів мембран, фрагментів ядерної ДНК відмираючих клітин, що, у свою чергу, викликає підвищення рівня аутоантитіл [5]. Показано, що значні зміни в продукції аутоантитіл, які виходять за фізіологічні межі і зберігаються місяцями, можуть носити дезадаптивний характер і стати причиною хвороби. Результати нашого дослідження підтверджують, що зниження протективної дії естрогенів, яке супроводжується зростанням рівня аутоантитіл до нативної ДНК і кардіоліпіну, може бути тригерним механізмом розвитку аутоімунних порушень у жінок в період постменопаузи.

Відомо, що серцево-судинні події у жінок в постменопаузі тісно пов'язані з підвищенням ризику тромбоутворення, який супроводжується

Таблиця

Рівень аутоантитіл в плазмі крові оварієктомованих щурів із МС, індукованим високофруктозною дієтою, (X, Me, min÷max), n=6

Група тварин	Антитіла до нативної ДНК, зворотний титр		Антитіла до кардіоліпіну, зворотний титр	
	X	Me, min÷max	X	Me, min÷max
Інтактний контроль	32,0	32,0 32,0÷32,0	8,0	8,0 8,48,0
Оварієктомія	64,0 ¹⁾	64,0 ¹⁾ 64,0÷64,0	24,0 ¹⁾	16,0 ¹⁾ 16,0÷32,0
Оварієктомія+ВФД+плацебо	64,0 ¹⁾	64,0 64÷64 ¹⁾	40,0 ¹⁾²⁾	32,0 32,0÷64,0 ¹⁾²⁾
Оварієктомія+ВФД+17 β -естрадіол	32,0 ²⁾³⁾	32,0 32,0÷32,0 ²⁾³⁾	9,3 ²⁾³⁾	8,0 4,0÷16,0 ²⁾³⁾

Примітка: ¹⁾ Статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи «Інтактний контроль», $p \leq 0,05$;

²⁾ Статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи «Оварієктомія», $p \leq 0,05$;

³⁾ Статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи «Оварієктомія+ВФД+ плацебо», $p \leq 0,05$;

посиленням експресії молекул адгезії, активації моноцитів, тромбоцитів, ушкодження ендотелію тощо [15] Отримані нами дані показують, що дефіцит естрогенів являється самостійним провокуючим фактором розвитку не лише аутоімунних, а й гіперкоагуляційних процесів, маркерами яких є підвищені рівні аутоантитіл до нативної ДНК та кардіоліпіну.

Поєднання овариєктомії з МС свідчить про посилення як імунологічного, так і дисбалансу коагуляційного гемостазу, а отже і підвищення загрози тромботичних ускладнень. Тобто, постменопаузальний метаболічний синдром є несприятливим сполученням, яке суттєво підвищує ризик розвитку аутоімунної та судинної патології.

Істотне зниження рівнів аутоантитіл до нативної ДНК і кардіоліпіну у овариєктомованих щурів із МС за умов введення 17 β -естрадіолу свідчить про протективний ефект екзогенного естрогену стосовно гуморальної ланки аутоімунітету та гемокоагуляційного

статусу. Отримані результати узгоджуються із даними клінічних досліджень щодо нормалізуючого впливу екзогенних естрогенів на рівень аутоантитіл у постменопаузальних жінок [9].

Висновки.

Дефіцит естрогенів є підґрунтям для порушення гуморальної ланки неспецифічного (вродженого) імунітету та розвитку аутоімунних захворювань і тромботичних ускладнень.

Поєднання овариєктомії з МС значно підвищує рівень аутоантитіл, що свідчить про посилення дисбалансу аутоімунітету та коагуляційного гемостазу.

17 β -естрадіол має протективні властивості стосовно ризику розвитку аутоагресії в організмі.

Отримані нами дані свідчать про **перспективність подальших досліджень** взаємодій систем та пошук адекватних лікарських засобів для корекції порушень у жінок в період постменопаузи.

Список літератури

1. Ackerman L. S. Sex hormones and the genesis of autoimmunity / L. S. Ackerman // Arch. Dermatol. – 2006. – V. 142, № 3. – P. 371-376.
2. Baeza I. Improvement of leucocyte functions in ovariectomized aged rats after treatment with growth hormone, melatonin, oestrogens or phyto-oestrogens / I. Baeza, C. Alvarado, P. Alvarez [et al.] // J. Reprod. Immunol. – 2009. – Vol. 80, № (1-2). – P. 70-79.
3. Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in apoptotic cells by flow- and image-cytometry / Z. Darzynkiewicz, H. Zhao // Methods. Mol. Biol. – 2011. – Vol. 682, № 1. – P. 91-101.
4. Fairweather D. Autoimmune heart disease: role of sex hormones and autoantibodies in disease pathogenesis / D. Fairweather, M. A. Petri, M. J. Coronado, L. T. Cooperr // Expert. Rev. Clin. Immunol. – 2012. – Vol. 8, № 3. – P. 269-284.
5. Feng F. The induction of the lupus phenotype by estrogen is via an estrogen receptor-alpha-dependent pathway / F. Feng, J. Nyland, M. Banyai [et al.] // Clin. Immunol. – 2010. – Vol. 134, № 2. – P. 226-236.
6. Frostegard J. Atherosclerosis in patients with autoimmune disorders / J. Frostegard // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2005. – Vol. 25, № 9. – P. 1776-1785.
7. Gameiro C. Changes in the immune system during menopause and aging / C. Gameiro, F. Romao // Front. Biosci. – 2010. – V. 2, № 1. – P. 299-303.
8. Ghazeeri G. Immunological differences in women compared with men: overview and contributing factors / G. Ghazeeri, L. Abdullah, O. Abbas // Am. J. Reprod. Immunol. – 2011. – Vol. 66, № 3. – P. 163-169.
9. Holroyd C. R. The effects of hormone replacement therapy on autoimmune disease: rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus / C. R. Holroyd, C. J. Edwards // Climacteric. – 2009. – Vol. 12, № 5. – P. 378-86.
10. Howell A. Where do selective estrogen receptor modulators (SERMs) and aromatase inhibitors (AIs) now fit into breast cancer treatment algorithms? / A. Howell, S. J. Howell, R. Clarke, E. Anderson // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. – 2001. – Vol. 79, № (1-5). – P. 227-237.
11. Lateef A. Hormone replacement and contraceptive therapy in autoimmune diseases / A. Lateef, M. Petri // J. Autoimmun. – 2012. – Vol. 38, № 2-3. – P. 170-176.
12. Levi B. Long-term fructose consumption accelerates glycation and several age-related variables in male rats / B. Levi, M. Werman // J. Nutrition. – 1998. – Vol. 128, № 8. – P. 1442-1449.
13. Matsuo Y. Metabolic syndrome is strongly associated with chronic subclinical inflammation in patients achieving optimal low-density lipoprotein-cholesterol levels in secondary prevention of cardiovascular disease / Y. Matsuo, T. Hashizume, S. Shioji, T. Akasaka // Circ. J. – 2008. – Vol. 72, № 12. – P. 2046-2050.
14. Matsuura E. Autoantibody-mediated atherosclerosis / E. Matsuura, K. Kobayashi, T. Koike, Y. Shoenfeld // Autoimmun. Rev. – 2002. – Vol. 1, № 6. – P. 348-353.
15. Quist-Paulsen P. Arterial cardiovascular risk factors and venous thrombosis: results from a population-based, prospective study (the HUNT2) / P. Quist-Paulsen, I. A. Næss, S. C. Cannegieter [et al.] // Haematologica. – 2010. – Vol. 95, № 1. – P. 119-125.

УДК 612.017.11:618.11-007.87:612.018.2

СТАН ГУМОРАЛЬНОЇ ЛАНКИ АУТОІМУНІТЕТУ У ОВАРІЕКТОМОВАНИХ ЩУРІВ ІЗ МЕТАБОЛІЧНИМ СИНДРОМОМ

Козар В. В.

Резюме. Показано, що дефіцит естрогенів є індукуючим фактором порушення гуморальної ланки аутоімунітету та посилення активності коагуляційних процесів, свідченням чого було вірогідне зростання рівня аутоантитіл до нативної ДНК та кардіоліпину. Поєднання гіпоестрогенії з МС посилювало дисбаланс імунологічного і тромботичного станів у тварин. Введення 17 β -естрадіолу суттєво знижувало рівні аутоантитіл у оваріектомованих щурів із МС, тобто чинило протективний ефект на імунну систему та коагуляційний гемостаз.

Ключові слова: дефіцит естрогенів, метаболічний синдром, антитіла до нативної ДНК і кардіоліпину, 17 β -естрадіол.

УДК 612.017.11:618.11-007.87:612.018.2

Состояние гуморального звена аутоиммунитета у овариэктомированных крыс с метаболическим синдромом

Козарь В. В.

Резюме. Показано, что дефицит эстрогенов является индуцирующим фактором нарушения гуморального звена аутоиммунитета и усиления активности коагуляционных процессов, о чем свидетельствовало достоверное увеличение уровня аутоантител к нативной ДНК и кардиолипину. Сочетание гипоестрогении и МС усиливало дисбаланс иммунологического и тромботического состояний у животных. Введение 17 β -эстрадиола значительно снижало урони аутоантител у овариэктомированных животных с МС, т. е. проявляло протективный эффект на иммунную систему и коагуляционный гемостаз.

Ключевые слова: дефицит эстрогенов, метаболический синдром, антитела к нативной ДНК и кардиолипину, 17 β -эстрадиол.

UDC 612.017.11:618.11-007.87:612.018.2

Condition Of The Humoral Link Of The Autoimmunity AtOvarioectomized Of Rats With The Metabolic Syndrome

Kozar V. V.

Summary. It was shown that deficiency of estrogens is an inducing factor of disturbance of a autoimmunity humoral link and of activity intensifying of coagulative processes what was proved by the reliable increase of autoantibodies level to native DNA and to cardioliipin. The combination of hypoestrogeniya and MS was strengthening an imbalance of immunologic and trombotic conditions at animals. The introduction of 17 β -estradiol was considerably reducing autoantibodies levels in ovarioectomized animals with MS, thus showed protective effect on immune system and a coagulative hemostasis.

Key words: deficiency of estrogens, a metabolic syndrome, antibodies to native DNA and a cardioliipin, 17 β -estradiol.

Стаття надійшла 1. 08. 2012 р.

Рецензент – проф. Олійник С. О.