

DOI: 10.26693/JMBS03.01.040

УДК 612-084:[615.37+618.11-007.87]

Козар В. В.¹, Єрмоєнко Р. Ф.¹, Должикова О. В.¹,
Горбенко Н. І.², Кудря М. Я.², Яременко Ф. Г.²

ЗМІНА КОНЦЕНТРАЦІЇ ЛЕПТИНУ В ОВАРІЕКТОМОВАНИХ ЩУРІВ ІЗ МЕТАБОЛІЧНИМ СИНДРОМОМ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ СПЛУК З ІМУНОМОДУЛЮЮЧОЮ АКТИВНІСТЮ

¹Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

²Державна установа «Інститут проблем ендокринної патології»
ім. В. Я. Данилевського НАМН України», Харків, Україна

kozarval@gmail.com

Було досліджено вплив сплук із імуномодулюючими властивостями левамизолу та похідного левамизолу-308 (ПЛ-308) на рівень лептину у оварієктомованих щурів із метаболічним синдромом (МС). Індукцію МС розпочинали через 2 тижні після хірургічного втручання шляхом утримання тварин на високоуглеводній дієті, яка забезпечувалася вільним доступом щурів до 30% розчину сахарози в якості питної води протягом 5 тижнів. Встановлено, що гіпоестрогенія призвела до зниження рівня лептину. При поєднанні дефіциту естрогенів із МС рівень лептину залишався таким же низьким, як і у оварієктомованих щурів без МС. Введення левамизолу та ПЛ-308 сприяло підвищенню рівня лептину, що свідчить про покращення метаболічного стану тварин на фоні імуномодуляції.

Ключові слова: левамизол, похідне левамизолу ПЛ-308, лептин, метаболічний синдром, дефіцит естрогенів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дана робота є фрагментом НДР «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. Менопауза характеризується зміненням гормональним статусом, в першу чергу зниженням рівня естрогенів. Саме з прогресуючою втратою естрогенів пов'язано підвищення ризику розвитку у жінок в постменопаузі ожиріння, діабету і серцево-судинних захворювань. Результати епідеміологічних досліджень свідчать, що захворювання серцево-судинної системи є відповідальними за третину усіх смертей жінок у світі та половину усіх смертей жінок у віці понад 50 років [1]. Головним фактором ризику серцево-судинної патології у жінок цієї вікової категорії вважають метаболічний синдром

(МС), незалежним предиктором компонентів якого визнано менопаузу [2].

Одним із гормонів/адипокінів, що секретує жирова тканина, є лептин, який відіграє важливу роль в центральному контролі енергетичного метаболізму, а також володіє багатьма плейотропними ефектами в різних фізіологічних системах [3]. При дослідженні ролі лептину в метаболічних процесах виявлено тісний зв'язок із інсулінорезистентністю та абдомінальним ожирінням, основними складовими МС. Показано, що інсулін може регулювати синтез лептину адипоцитами, а хронічна гіперінсулінемія, яка є характерною для постменопаузального МС, збільшує секрецію лептину [4].

Одна із периферичних функцій лептину полягає у взаємодії між енергетичним обміном і імунною системою, тому йому відводять важливу роль у новій області – імунометаболічній [5]. Лептинові рецептори експресуються на усіх клітинах імунної системи, а регуляторні ефекти лептину включають вплив на фактори як вродженої, так і адаптивної імунної відповіді. Зниження концентрації лептину в плазмі під час голодування призводить до порушення імунної функції. І навпаки, підвищені рівні циркулюючого лептину при ожирінні, вносять вклад в запальний стан низької інтенсивності, що робить людей із ожирінням більш сприйнятливими до підвищеного ризику розвитку серцево-судинних захворювань, діабету, дегенеративних, аутоімунних захворювань і раку [6].

Рівень лептин має також взаємозв'язок із рівнем естрогенів, проте він не такий однозначний. В ряді досліджень вказано, що дефіцит естрогенів знижує рівні лептину, в більшості інших досліджень не виявлено відмінності в рівнях лептину між періодами пре- і постменопаузи у жінок при зіставленні з індексом маси тіла. В других дослідженнях показано збільшення рівня лептину з часом, проте він корелюван також із збільшенням маси тіла

Введення 17 β -естрадіолу оварієктомованим тваринам покращувало чутливість гіпофіза до лептину [7].

На сьогодні досить активно вивчається роль лептину у модулюванні не лише метаболічних, енергетичних, а й імунологічних ефектів, в тому числі і як можливої цілі для втручання в імунометаболічно опосередковану патофізіологію. Тому вивчення впливу сполук із імуномодулюючими властивостями на рівень лептину за умов дефіциту естрогенів є актуальним напрямком досліджень.

В лабораторії синтезу гормоноподібних сполук ДУ «ІПЕП ім. В.Я. Данилевського НАМНУ» (м. Харків) було синтезовано сполуку похідне левамізолу-308 (ПЛ-308), яка за даними гострої токсичності відповідає 5 класу токсичності (практично нетоксичні сполуки), тоді як левамизол – 4 класу (мало токсичні сполуки). Раніше нами були досліджені імуномодулюючі властивості сполуки в умовах *in vitro* та *in vivo*.

Метою роботи було дослідження впливу левамізолу та його похідного ПЛ-308 на концентрацію лептину у щурів із МС на тлі дефіциту естрогенів.

Об'єкт і методи дослідження. Досліди проведено на 3-місячних білих щурах-саміцях лінії Вістар. Гіпоестрогенію відтворювали шляхом двосторонньої оварієктомії під легким ефірним наркозом. Індукцію МС розпочинали через 2 тижні після хірургічного втручання. Високоуглеводна дієта (ВВД) забезпечувалася вільним доступом тварин до 30% розчину сахарози в якості питної води протягом 5 тижнів. Усі групи тварин знаходилися на звичайному раціоні віварію.

Було сформовано 5 груп тварин: 1 група – інтактний контроль; 2 група – оварієктомовані щури («Оварієктомія»); 3 група – оварієктомовані щури, які отримували 30% розчин сахарози і плацебо («Оварієктомія + ВВД + плацебо»); 4 група – оварієктомовані щури, які отримували 30% розчин сахарози та левамизол у дозі 2,5 мг/кг маси тіла («Оварієктомія + ВВД + Левамизол»); 5 група – оварієктомовані щури, які отримували 30% розчин сахарози та ПЛ-308 у дозі 4,0 мг/кг маси тіла («Оварієктомія + ВВД + ПЛ-308»). Сполуки вводили перорально за допомогою зонду протягом 5 тижнів за такою схемою: перші 3 дні тварини отримували досліджувані сполуки, наступні 4 дні – перерва.

Метаболічний синдром у тварин був верифікований за даними внутрішньочеревинного тесту толерантності до глюкози (ВЧТТГ), який вважають одним із об'єктивних непрямих методів оцінки інсулінорезистентності, та масою тіла. Стан глюкозного гомеостазу оцінювали за показниками базальної глікемії та ВЧТТГ (3 г глюкози на 1 кг маси тіла). Вміст глюкози у крові визначали глюкозооксидазним методом за допомогою ферментативного аналізатора глюкози «Ексан-Г». Площу під глікемічними

кривими (ППК) визначали за допомогою комп'ютерної програми «Mathlab». Концентрацію лептину визначали методом імуноферментного аналізу на аналізаторі «Stat Fax 2100» (USA) за допомогою наборів фірми Diameb (USA).

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

Статистичне опрацювання матеріалу проведено з обчисленням середнього арифметичного значення та його статистичної похибки ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$), медіани (Me), мінімальних і максимальних дат (min ÷ max). Для аналізу відмінностей застосовували критерій Ньюмена-Кейлса, критерій Дана. Критичний рівень значущості при перевірці статистичної гіпотези приймали на рівні 0,05.

Результати досліджень та їх обговорення.

Встановлено, що утримання оварієктомованих тварин на ВВД супроводжувалося вірогідним порушенням толерантності до вуглеводів та збільшення маси тіла ($p \leq 0,05$), важливих складових МС (табл.). Введення сполук із імуномодулюючими властивостями не впливало значуще на масу тіла тварин, проте нормалізувало ППК ($p \leq 0,05$), тобто левамизол та його похідне ПЛ-308 зменшували прояви інсулінорезистентності в оварієктомованих тварин із МС.

Отримані результати співпадають з іншими дослідженнями, які показали, що левамизол в умовах *in vivo* проявляє тимомиметичну дію (Goldstein G., 1978), що сприяє збільшенню рецепторів до інсуліну на інсулінозалежних клітинах, до яких, зокрема, належать адипоцити, що може зменшувати прояви інсулінорезистентності.

У групі тварин «Оварієктомія» та «Оварієктомія + ВВД + плацебо» зафіксовано зниження концентрації лептину в сироватці крові по відношенню до інтактних тварин у вигляді тенденції (відповідно $8,20 \pm 0,15$ нг/мл та $8,10 \pm 0,10$ нг/мл проти $9,00 \pm 0,30$ нг/мл; $0,05 < p < 0,1$). Результат у вигляді тенденції може бути обумовлений незначною тривалістю експерименту.

Зниження концентрації лептину у щурів груп «Оварієктомія» та «Оварієктомія + ВВД + плацебо» може бути пов'язано саме з формуванням/розвитком інсулінорезистентності [4], на що вказує збільшення площі під глікемічною кривою у цих тварин.

Введення левамізолу та ПЛ-308 підвищувало концентрацію лептину в сироватці крові оварієктомованих щурів із МС у порівнянні з тваринами груп «Оварієктомія» та «Оварієктомія + ВВД + плацебо» ($p \leq 0,05$), і їх показники достовірно не відрізнялися від значень у групі інтактних тварин. У роботі [9] продемонстровано, що у постменопаузальних жінок із надлишковою масою тіла без діабету рівні лептину не були пов'язані з підвищеним ризиком ішемічної хвороби серця (ІХС), тоді як у групі з

Таблиця – Показники площі під глікемічною кривою та приросту маси тіла у оварієктомованих тварин на тлі метаболічного синдрому та введення левамізолу і ПЛ- 308, $(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$, (Me, min-max)

Група тварин	n	ППК, ммоль/л хв	Приріст маси тіла, %		Лептин, нг/мл
			Me	min-max	
Інтактний контроль	5	528,00±10,60	16,67	5,56÷37,93	9,00±0,30
Оварієктомія	5	630,00±56,04 ¹⁾	29,55 ¹⁾	17,50÷48,15	8,20±0,15 ¹⁾
Оварієктомія +ВВД+ плацебо	5	731,16±29,98 ¹⁾²⁾	37,84 ²⁾	30,77÷80,65	8,10±0,10 ¹⁾
Оварієктомія +ВВД+ Левамізол	6	533,10±16,38 ³⁾	35,55	21,43÷42,42	11,30±0,80 ²⁾³⁾
Оварієктомія +ВВД+ ПЛ-308	6	572,50±18,30 ³⁾	31,78	26,83÷38,64	10,00±0,80 ²⁾³⁾

Примітки: ¹⁾ Зміни у вигляді тенденції у порівнянні з показниками групи «Інтактний контроль», 0,05<p<0,1; ²⁾ Статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи «Інтактний контроль», p<0,05; ³⁾ Статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи «Оварієктомія», p<0,05; ³⁾ Статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи «Оварієктомія + ВВД + плацебо», p<0,05.

діабетом і порушеною толерантністю до вуглеводів низькі рівні лептину були асоційовані з ризиком ІХС і смертністю від серцево-судинних захворювань. У той же час, при ожирінні, яке підвищує ризик гіпертрофії лівого шлуночка, більш високі рівні лептину корелюють із більш сприятливими значеннями ряду показників структури і функції лівого шлуночка.

Як відомо, левамізолу притаманні виразні імунomodуючі ефекти [8], що може бути одним із факторів підвищення рівня лептину в оварієктомованих тварин із МС. Отже, левамізол та його похідне ПЛ-308 підвищуючи рівень лептину, можливо, можуть зменшувати ризик ІХС за умов поєднання інсулінорезистентності з гіпоестрогенією.

Таким чином, дослідження продемонструвало позитивний вплив сполук із імунomodуючими властивостями на визначені показники у оварієктомованих щурів із МС. За ефективністю похідне левамізолу ПЛ-308 не відрізнялося від дії препарату порівняння левамізолу, що свідчить про перспективність подальшого вивчення сполуки. Зважаючи на тісні взаємозв'язки між імунною та ендокринною системами, можна припустити, що нормалізація функціональних можливостей імунної системи при

МС на тлі гіпоестрогенії за умов застосування оригінальної сполуки ПЛ-308 матиме позитивний вплив на стан ендокринної регуляції в жировій тканині та зменшення проявів МС.

Висновки

1. Дефіцит естрогенів у поєднанні з високовуглеводною дієтою спричинюють розвиток інсулінорезистентності та зростання маси тіла, основними проявами метаболічного синдрому.
2. Дефіцит естрогенів являється самостійним чинником зниження концентрації лептину в сироватці крові тварин. Поєднання гіпоестрогенії з метаболічним синдромом додатково не вплинуло на рівень лептину.
3. Левамізол та ПЛ-308 покращують метаболічний стан тварин, про що свідчить нормалізація концентрації лептину та зменшення інтолернтності до вуглеводів.

Перспективи подальших наукових досліджень. Отримані дані свідчать про перспективність подальшого вивчення впливу фармакологічних засобів із імунomodуючими властивостями на патогенетичні складові постменопаузальних метаболічних розладів.

Конфлікт інтересів: відсутній.

References

1. Ghantous CM, Azrak Z, Hanache S, Abou-Kheir W, Zeidan A. Differential Role of Leptin and Adiponectin in Cardiovascular System. *International Journal of Endocrinology*. 2015; 2015: Article ID 534320, 13 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/534320>.
2. Maturana MA, Franz RF, Metzendorf M, da Silva TR, Spritzer PM. Subclinical cardiovascular disease in postmenopausal women with low/medium cardiovascular risk by the Framingham risk score. *Maturitas*. 2015; 81 (2): 311-6. PMID: 25869902. DOI: 10.1016/j.maturitas.2015.03.012.
3. Abella V, Scotecce M, Conde J, Pino J, Gonzalez-Gay MA, Gómez-Reino JJ, Mera A, Lago F, Gómez R, Gualillo O. Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. *Nature Reviews Rheumatology*. 2017; 13 (2): 100-9. PMID: 28053336. DOI: 10.1038/nrrheum.2016.209.
4. Chedraui P, Pérez-López FR, Escobar GS, Palla G, Montt-Guevara M, Cecchi E, Genazzani AR, Simoncini T. Circulating leptin, resistin, adiponectin, visfatin, adipisin and ghrelin levels and insulin resistance in postmenopausal women with and without the metabolic syndrome. *Maturitas*. 2014; 79 (1): 86-90. PMID: 25015014. DOI: 10.1016/j.maturitas.2014.06.008.
5. Pérez-Pérez A, Vilariño-García T, Fernández-Riejos P, Martín-González J, Segura-Egea JJ, Sánchez-Margalet V. Role of leptin as a link between metabolism and the immune system. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2017; 35: 71-84. PMID: 28285098. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2017.03.001.
6. Procaccini C, La Rocca C, Carbone F, De Rosa V, Galgani M, Matarese G. Leptin as immune mediator: Interaction between neuroendocrine and immune system. *Developmental & Comparative Immunology*. 2017; 66: 120-9. PMID: 27288847. DOI: 10.1016/j.dci.2016.06.006.

7. Yin C, Kang L, Lai C, Zhou J, Shi B, Zhang L, Chen H. Effects of 17 β -estradiol on leptin signaling in anterior pituitary of ovariectomized rats. *Experimental Animals*. 2017; 66 (2): 159-166. PMID: PMC5411302. doi: 10.1538/expanim.16-0087.
8. Lai X, Pei Q, Song X, Zhou X, Yin Z, Jia R, Zou Y, Li L, Yue G, Lia X, Yin L, Lv C, Jing B. The enhancement of immune function and activation of NF- κ B by resveratrol-treatment in immunosuppressive mice. *International Immunopharmacology*. 2016; 33: 42-7. PMID:26854575. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.01.028.
9. Mackey RH, McTigue KM, Chang YF, Barinas-Mitchell E, Evans RW, Tinker LF, Lewis CE, Manson JE, Stefanick ML, Howard BV, Phillips LS, Liu S, Kulick D, Kuller LH. Lipoprotein particles and size, total and high molecular weight adiponectin, and leptin in relation to incident coronary heart disease among severely obese postmenopausal women: The Women's Health Initiative Observational Study. *BBA Clinical*. 2015; 3: 243-50. PMID: 25825692. PMID: PMC4375554. DOI: 10.1016/j.bbacli.2015.03.005.

УДК 612-084:[615.37+618.11-007.87]

ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ЛЕПТИНА У ОВАРИЭКТОМИРОВАННЫХ КРЫС С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ ПРИ ВВЕДЕНИИ СОЕДИНЕНИЙ С ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ

Козарь В. В., Еременко Р. Ф., Должикова О. В., Горбенко Н. И.,
Кудря М. Я., Яременко Ф. Г.

Резюме. Было исследовано влияние соединений с иммуномодулирующими свойствами левамизола и производного левамизола-308 (ПЛ-308) на уровень лептина в овариэктомированных крыс с метаболическим синдромом (МС). Индукцию МС начинали через 2 недели после хирургического вмешательства путем удержания животных на высокоуглеводной диете, которая обеспечивалась свободным доступом крыс до 30% раствора сахарозы в качестве питьевой воды в течение 5 недель. Установлено, что гипозэстрогения привела к снижению уровня лептина. При сочетании дефицита эстрогенов с МС уровень лептина оставался таким же низким, как и в овариэктомированных крыс без МС. Введение левамизола и ПЛ-308 способствовало повышению уровня лептина, что свидетельствует об улучшении метаболического состояния животных фоне иммуномодуляции.

Ключевые слова: левамизол, производное левамизола ПЛ-308, лептин, метаболический синдром, дефицит эстрогенов.

UDC 612-084:[615.37+618.11-007.87]

Changing of Leptin Concentration in Ovariaectomized Rats with Metabolic Syndrome in the Conditions of Immune Activity Compounds Administration

Kozar V. V., Yeriomenko R. F., Dolzhykova O. V., Gorbenko N. I.,
Kudria M. Y., Yaremenko F. G.

Abstract. Today the role of leptine in modulating methabolic, energetic and immune effects is actively studied. The effect of compounds with immunomodulating properties on the course of the metabolic syndrome (MS) in combination with hypoestrogeny has not been sufficiently studied today. In the laboratory of hormone-like compounds synthesis of the State Institution "V. Danilevsky Institute for Endocrine Pathology Problems of National Academy of Medical Science of Ukraine" (Kharkiv, Ukraine) we have synthetically produced the derivative of levamisole-308 (PL-308) which corresponds to the class 5 of toxicity (almost non-toxic compounds) according to the acute toxicity data, when the levamisole corresponds to the class 4 (low-toxic compounds).

The purpose of research is to investigate the effect of levamisole and its derivative PL-308 on the leptin concentration in rats with MS against a background of estrogen deficiency.

The object and methods of research. The tests are made on the 3-month white female rats of the line Vistar. We reproduced the hypoestrogeny by the way of two-side ovariaectomy with the light etherization. We preceded the induction of MS within 2 weeks after of the operative intervention. The high-carbohydrate diet (HCD) was provided by the free access to the 30 % sweet water as a potable water during 5 weeks.

Insulin resistance was determined by the parameters of the area under the glycemic curve, body weight and leptin level (by ELISA method) in the ovariaectomized female rats with MS in conditions of administration of compounds with immunomodulatory properties such as levamisole and its derivative PL-308. The compounds were administered for 5 weeks by the means of a zonde.

Results and discussion. The combination of the hypoestrogeny with the MS causes the carbohydrate intolerance and body mass increase with the animals. The administration of immunomodulatory compounds didn't influence on the animals body mass but normalized the square of glycemic curve. The hypoestrogeny causes the decrease of the leptine level. The combination of the estrogen deficit with MS doesn't influence the index further. The administration of levamisole and PL-308 has promoted the increase of the leptine level.

Conclusions. The levamisole and its derivative PL-308 have improved the metabolic conditions with the animals which is proved by the leptine level increase and the carbohydrates intolerance decrease.

Keywords: levamisole, levamisole derivate PL-308, leptin, metabolic syndrome, deficiency of estrogens.

Стаття надійшла 12.11.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування