

## ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ АФІННО ОЧИЩЕНИХ АНТИТІЛ ДО ЕНДОКАНАБІНОЇДНОГО РЕЦЕПТОРА НА ВМІСТ ЦИТОКІНІВ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ІНСУЛІНОРЕЗИСТЕНТНОСТІ В ЩУРІВ

*У результаті проведених досліджень встановлено, що тривале внутрішньочеревне введення дексаметазону на фоні фруктозної дієти супроводжується формуванням синдрому інсулінорезистентності в щурів. За умов наших експериментів спостерігали патологічні зміни цитокінового (зниження вмісту адипонектину і зростання концентрації резистину, ІЛ-6, ФНП- $\alpha$ ) та гормонального (виникнення гіперкортикостеронемії) профілів сироватки крові. Показано, що введення протягом 3 тижнів досліджуваного препарату на основі афінно очищених антитіл до ендоканабіноїдного рецептора значною мірою нормалізує зазначені показники, що проявляється підвищенням вмісту адипонектину, пригніченням продукування резистину, прозапальних цитокінів (ІЛ-6, ФНП- $\alpha$ ), зменшенням виразності гіперкортикостеронемії. У здорових тварин, яких утримували на стандартному харчовому раціоні віварію, застосування досліджуваного препарату не призводило до змін показників, які вивчали.*

КЛЮЧОВІ СЛОВА: метаболічний синдром, ожиріння, адипонектин, резистин, інтерлейкіни.

ВСТУП. Епідеміологічні дані останніх років свідчать про неухильні темпи зростання числа хворих на метаболічні захворювання – метаболічний синдром (МС), цукровий діабет 2 типу (ЦД2), ожиріння, атеросклероз та ін. [1, 2]. В основі патогенезу перерахованих патологій лежить розвиток синдрому інсулінорезистентності (ІР), який характеризується зменшенням чутливості клітин до дії інсуліну, що тягне за собою порушення практично всіх видів обміну [3].

За умов формування ІР розвиваються патологічні зміни метаболічної активності жирової тканини. Адипоцити продукують велику кількість біологічно активних молекул: адіпокіни (адипонектин, резистин, вістафін та ін.), прозапальні інтерлейкіни (ІЛ-6, ІЛ-8), фактор некрозу пухлини (ФНП- $\alpha$  і ФНП- $\beta$ ), активатор інгібітора плазміногену-1, компоненти комплексу (С3, фактори В та D), С-реактивний протеїн, компоненти ренін-ангіотензинової системи (ангіотензиноген, ангіотензин-II) [4, 5]. Функціональний дисбаланс зазначених факторів призводить до формування патологічних змін метаболічних ланок.

На сьогодні не існує універсальних схем фармакотерапії МС, тому застосовують терапев-

© А. Л. Загайко, Т. О. Брюханова, 2015.

тичну тактику лікувального впливу на окремі складові патогенезу, в тому числі на ожиріння як на один із головних пускових факторів. Однією з найбільш перспективних терапевтичних мішеней при лікуванні ожиріння є вплив на ендоканабіноїдну систему [6].

Зважаючи на визначну роль біологічно активних молекул, що секретуються жировою тканиною, в розвитку, прогресуванні та обтяженні перебігу ожиріння і, відповідно, МС, було б доцільним дослідити вплив препарату на основі афінно очищених антитіл до ендоканабіноїдного рецептора 1 типу (CB-1) на вміст окремих цитокінів за експериментальної ІР у щурів і, тим самим, оцінити доцільність його застосування при МС.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для експериментів використовували щурів-самців лінії Вістар масою 160–200 г, у яких моделювали синдром ІР шляхом тривалого введення (протягом 5 тижнів) низьких доз дексаметазону внутрішньочеревно та утримування на дієті з високим вмістом фруктози [7].

Тварин утримували при температурі (22±1) °С, вологості 50–60 % у кімнаті зі зміною світлових режимів “день–ніч”. Щурів поділили на

чотири дослідних групи (по 10 тварин у кожній) залежно від мети експерименту:

– інтактний контроль (ІК) – здорові тварини, яких утримували на стандартному харчовому раціоні віварію;

– модельна патологія (МП) – тварини, яким протягом 5 тижнів вводили внутрішньочеревно дексаметазон у дозі 1,5 мг/кг та яких утримували на дієті, збагаченій фруктозою (з розрахунку 1 г фруктози на 100 г маси тіла щура): 60,3 % фруктози, 18,3 % білка, 5,2 % жирів;

– тварини, яким на фоні введення дексаметазону, починаючи з 4 тижня введення глюкокортикостероїду та утримання на фруктозній дієті, починали вводити внутрішньошлунково препарат “Дієстресса” за допомогою металевого зонда в ефективній терапевтичній дозі (з урахуванням індексу видової чутливості) протягом 3 тижнів;

– здорові тварини, яких утримували на стандартному харчовому раціоні віварію і яким протягом 3 тижнів вводили внутрішньошлунково препарат “Дієстресса” за допомогою металевого зонда в ефективній терапевтичній дозі (з урахуванням індексу видової чутливості).

У сироватці крові тварин визначали маркери цитокинового профілю (адипонектин, ІЛ-6, ФНП- $\alpha$ , резистин) та вміст кортикостерону.

Дослідження проводили відповідно до Загальних етичних принципів експериментів на тваринах (Україна, 2001), узгоджених з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) та Етичним кодексом Всесвітньої медичної асоціації (Гельсінська декларація, 1964).

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми STATISTICA (StatSoftInc., США, версія 6.0). Значимість міжгрупових відмінностей оцінювали з використанням однофакторного дисперсійного аналізу для кількох незалежних груп (ANOVA).

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** При тривалому введенні низьких доз дексаметазону на фоні фруктозної дієти у піддослідних тварин формувалася синдром ІР, який супроводжувався розвитком виразної гіперглікемії і гіперінсулінемії, що було продемонстровано в наших попередніх дослідженнях та узгоджується з даними наукової літератури [7].

У щурів групи МП спостерігали патологічні зміни цитокинового профілю, що є характерним для стану ІР. Достовірно знижувався вміст адипонектину (у 2,01 раза відносно здорових тварин), який у нормі володіє широким спектром фізіологічних ефектів: пригнічує інтенсивність глюконеогенезу, регулюючи вміст глюкози в

крові; збільшує афінність гепатоцитів та міоцитів до дії інсуліну; перешкоджає формуванню гіпертриацилгліцеролемії шляхом підвищення експресії генів ключових ферментів окиснення жирних кислот; зменшує продукування прозапальних цитокінів, зокрема ФНП- $\alpha$  та інтерлейкінів, блокує активацію NF- $\kappa$ B; проявляє антиатерогенну дію [8, 9].

Резистин, який також належить до адипокінів, що секретуються жировою тканиною, є функціональним антагоністом адипонектину. Для резистину характерні підвищення інтенсивності глюконеогенезу шляхом активації експресії генів відповідних ферментів; пригнічення поглинання глюкози скелетними м'язами; нівелювання інсулініндукованого зменшення продукування глюкози гепатоцитами [10]. Зростання вмісту резистину є фактором, що визначає прогресування та обтяження перебігу ІР. За умов наших експериментів ми спостерігали вірогідне збільшення (у 1,69 раза відносно інтактних щурів) його вмісту в сироватці крові (табл.). Така динаміка змін підтверджувала розвиток синдрому ІР та свідчила про виразність патологічного процесу.

Розвиток ІР супроводжується збільшенням маси жирової тканини, метаболізм якої порушується, що призводить до зростання продукування прозапальних цитокінів – ІЛ-6 та ФНП- $\alpha$ , секреція яких перебуває у прямій залежності від кількості жирової тканини [11, 12]. ІЛ-6 активує гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозну систему, що опосередковує підвищення концентрації кортикостерону та формування гіперкортикостеронемії, що мало місце і за умов наших експериментів (табл.). Даний інтерлейкін стимулює синтез гострофазних білків, збільшує продукування ліпопротеїнів дуже низької густини (ЛДНГ) при зменшенні активності ліпопротеїніпази крові (ЛПЛ), що зумовлює формування атерогенної дисліпідемії [12]. У тварин з експериментальною ІР вміст ІЛ-6 був у 4,68 раза вищим, ніж у здорових.

ФНП- $\alpha$  розглядають як медіатор ІР, оскільки він має прямий інгібуючий вплив на інсулінові рецептори через тирозинкіназний механізм [11]. ФНП- $\alpha$  нівелює фізіологічні ефекти адипонектину, поглиблюючи виразність та обтяжуючи перебіг ІР і супутніх захворювань. За умов наших експериментів у тварин групи МП спостерігали вірогідне зростання вмісту ФНП- $\alpha$  (табл.).

Гіперкортикостеронемія тягне за собою інтенсивне вивільнення вільних жирних кислот (ВЖК), що зумовлено як прямим ліполітичним впливом, так і опосередковано – через стимуляцію секреції катехоламінів, які також проявляють ліполітичну дію, що реалізується

Таблиця – Вплив антитіл до ендоканабіноїдного рецептора СВ-1 на показники цитокинового профілю та вміст кортикостерону в сироватці крові щурів за експериментальної інсулінорезистентності (n=10)

| Показник             | ІК           | МП            | ІР+дієтреса    | ІК+дієтреса  |
|----------------------|--------------|---------------|----------------|--------------|
| Кортикостерон, нг/мл | 325,61±12,15 | 589,33±16,05* | 338,5±12,68**  | 337,15±10,05 |
| Адипонектин, нг/мл   | 264,35±10,11 | 131,65±10,88* | 249,05±10,15** | 256,44±12,18 |
| Резистин, нг/мл      | 98,95±9,75   | 167,38±11,53* | 122,15±9,55**  | 103,12±5,44  |
| ІЛ-6, пг/мл          | 0,41±0,02    | 1,92±0,08*    | 0,72±0,03**    | 0,39±0,05    |
| ФНП-α, пг/мл         | 7,98±0,05    | 10,66±0,06*   | 8,91±0,09**    | 7,78±0,05    |

Примітка. \* – зміни достовірні відносно показників інтактного контролю (p<0,05); \*\* – зміни достовірні відносно показників модельної патології (p<0,05).

через цАМФ-залежний механізм. ВЖК мають ліпотоксичну дію, активують сигнальні шляхи у клітині, збільшують вміст активних форм кисню, що в цілому сприяє прогресуванню ІР [13]. Зростання концентрації кортикостерону розглядають як одну з ключових складових патогенезу ІР [15].

Застосування досліджуваного препарату значною мірою нівелювало негативні зміни цитокинового профілю на фоні експериментальної патології. Слід відмітити його виразний вплив на вміст адипонектину, який практично не відрізнявся від показника здорових тварин. Імовірно, така динаміка пояснюється нормалізацією метаболічних процесів у жировій тканині в результаті збільшення чутливості СВ-1 до ендогенних канабіноїдів, що супроводжується поверненням ліпогенезу, який активується при ІР, до вихідного рівня. При цьому рівень резистину суттєво знижувався порівняно зі щурами групи МП. Оскільки високий рівень резистину опосередковує поглиблення та обтяження перебігу ІР шляхом нейтралізації інгібуючого впливу інсуліну на продукування глюкози печінкою і пригнічення споживання глюкози скелетними м'язами, нормалізацію його концентрації під дією досліджуваного препарату можна розглядати як важливий компонент лікувального впливу за експериментальної патології.

Підвищення рівня адипонектину опосередковувало зменшення продукування прозапальних факторів – ІЛ-6 та ФНП-α [16]. Достовірне зниження рівня зазначених цитокінів під дією досліджуваного препарату усувало їх патологічні ефекти (збільшення секреції лептину і порушення харчової поведінки, розвиток оксидативного стресу/окисні ушкодження ЛНГ, що призводять до атерогенезу), що проявлялось нормалізацією відповідних метаболічних ланок.

Усунення гіперкортизолемії, що мала місце за умов наших експериментів, було зумовлене комплексним впливом. З одного боку, нівелювання виразності ІР та гіперінсулінемії закономірно приводило до зменшення продуку-

вання контрінсулярних гормонів, до яких належить і кортикостерон. З іншого боку, нормалізація цитокинового профілю, зокрема секреції ІЛ-6 та ФНП-α, запобігала активації гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної системи і надмірному продукуванню кортикостероїдів.

Слід зазначити, що у здорових тварин, які перебували на стандартному раціоні та отримували досліджуваний препарат, не спостерігали змін показників, які вивчали.

**ВИСНОВКИ.** 1. Тривале внутрішньочеревне введення щурам низьких доз дексаметазону в поєднанні з фруктозною дієтою призводило до комплексу патологічних змін метаболізму, що визначалися як інсулінорезистентність – ключова складова патогенезу розвитку метаболічного синдрому.

2. Розвиток інсулінорезистентності супроводжувався негативними змінами цитокинового і гормонального профілів сироватки крові, що проявлялося достовірним зниженням вмісту адипонектину на фоні вірогідного зростання концентрації резистину та прозапальних факторів (ІЛ-6 і ФНП-α).

3. На фоні експериментальної ІР розвивалася виразна гіперкортикостеронемія, що була зумовлена підвищеною секрецією прозапальних цитокінів та гіперпродукуванням інсуліну, яка супроводжувалась збільшенням вмісту контрінсулярних гормонів, насамперед кортикостерону.

4. Застосування досліджуваного препарату на основі афінно очищених антитіл до ендоканабіноїдного рецептора СВ-1 ефективно нівелювало патологічні зміни вмісту цитокінів та кортикостерону. Зазначене проявлялося зростанням продукування адипонектину при нормалізації концентрації ІЛ-6, ФНП-α та резистину. Концентрація кортикостерону в сироватці крові тварин достовірно не відрізнялась від показника здорових щурів.

5. У здорових тварин, яких утримували на стандартному харчовому раціоні віварію, застосування досліджуваного препарату не

призводило до змін показників, які вивчали. Усі маркери цитокінового та гормонального профілів перебували в межах фізіологічної норми, що

свідчить про реалізацію терапевтичного ефекту препарату тільки за умов патології.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Gallagher E. J. The metabolic syndrome-from insulin resistance to obesity and diabetes / E. J. Gallagher, D. LeRoith, E. Karnieli // *Medical Clinics of North America*. – 2011. – **95**, № 5. – P. 855–873.
2. Dichi I. Metabolic syndrome: new targets for an old problem / I. Dichi, A. N. Simão // *Expert opinion on therapeutic targets*. – 2012. – **16**, № 2. – P. 147–156.
3. Romeo G. R. Metabolic syndrome, insulin resistance, and roles of inflammation—mechanisms and therapeutic targets / G. R. Romeo, J. Lee, S. E. Shoelson // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2012. – **32**, № 8. – P. 1771–1776.
4. Illán-Gómez F. Obesity and inflammation: change in adiponectin, C-reactive protein, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 after bariatric surgery / F. Illán-Gómez // *Obesity surgery*. – 2012. – **22**, № 6. – P. 950–955.
5. Бояринова М. А. Адипокины и кардиометаболический синдром / М. А. Бояринова, О. П. Ротарь, А. О. Конради // *Артериальная гипертензия*. – 2014. – **20**, № 5. – С. 422–432.
6. Kheyfets I. A. Experimental Study of the Effects of Dietressa, a New Weight-Reducing Drug / I. A. Kheyfets // *Bulletin of experimental biology and medicine*. – 2012. – **152**, № 3. – P. 321–324.
7. Загайко А. Л. Модифікація методу моделювання експериментальної інсулінорезистентності у щурів : інформаційний лист / А. Л. Загайко, Т. О. Брюханова, А. І. Шапо. – К., 2015. – № 86. – 7 с.
8. Lu J. Y. Adiponectin: a biomarker of obesity-induced insulin resistance in adipose tissue and beyond / J. Y. Lu // *Journal of biomedical science*. – 2008. – **15**, № 5. – P. 565–576.
9. Ziemke F. Adiponectin in insulin resistance: lessons from translational research / F. Ziemke, C. S. Mantzoros // *The American journal of clinical nutrition*. – 2010. – **91**, № 1. – P. 258S–261S.
10. Sadashiv S. T. Over expression of resistin in adipose tissue of the obese induces insulin resistance / S. T. Sadashiv // *World journal of diabetes*. – 2012. – **3**, № 7. – P. 135–144.
11. Lukic L. Hypertension in obese type 2 diabetes patients is associated with increases in insulin resistance and IL-6 cytokine levels: potential targets for an efficient preventive intervention / L. Lukic // *International journal of environmental research and public health*. – 2014. – **11**, № 4. – P. 3586–3598.
12. Westerink J. Pharmacological and non-pharmacological interventions to influence adipose tissue function / J. Westerink, F. L. Visseren // *Cardiovascular diabetology*. – 2011. – **10**, № 1. – P. 13–21.
13. Karpe F. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation / F. Karpe, J. R. Dickmann, K. N. Frayn // *Diabetes*. – 2011. – **60**, № 10. – P. 2441–2449.
14. Ивашкин В. Т. Липотоксичность и метаболические нарушения при ожирении / В. Т. Ивашкин, М. В. Маевская // *Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол.* – 2010. – **20**, № 1. – С. 4–13.
15. la Fleur S. E. The effects of glucocorticoids on feeding behavior in rats / la S. E. Fleur // *Physiology & behavior*. – 2006. – **89**, № 1. – P. 110–114.
16. Rodina A. V. The role of adiponectin in the pathogenesis of the metabolic syndrome and approach to therapy / A. V. Rodina, S. E. Severin // *Patologicheskaja fiziologija i eksperimental'naja terapija*. – 2012. – № 1. – P. 15–26.

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АФФИННО ОЧИЩЕННЫХ АНТИТЕЛ К ЭНДОКАННАБИНОИДНОМУ РЕЦЕПТОРУ НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У КРЫС

### Резюме

В результате проведенных исследований установлено, что длительное внутривентральное введение дексаметазона на фоне фруктозной диеты сопровождается формированием синдрома инсулинорезистентности у крыс. В условиях наших экспериментов наблюдали патологические изменения цитокинового (снижение содержания адипонектина и возрастание концентрации резистина, ИЛ-6, ФНО- $\alpha$ ) и гормонального (возникновение гиперкортикостеронемии) профилей сыворотки крови. Показано, что введение в течение 3 недель исследуемого препарата на основе аффинно очищенных антител к эндоканнабиноидному рецептору в значительной степени нормализует эти показатели, что проявляется повышением содержания адипонектина, угнетением продуцирования резистина, провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ФНО- $\alpha$ ), уменьшением выраженности гиперкортикостеронемии. У здоровых животных, которые содержались на стандартном пищевом рационе вивария, применение исследуемого препарата не приводило к изменениям изучаемых показателей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: метаболический синдром, ожирение, адипонектин, резистин, интерлейкины.

A. L. Zahayko, T. O. Briukhanova  
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

## STUDY OF THE INFLUENCE OF AFFINITY PURIFIED ANTIBODIES AGAINST ENDOCANNABINOID RECEPTOR ON CYTOKINES CONTENT IN THE RATS AT EXPERIMENTAL INSULIN RESISTANCE

### Summary

The studies have revealed that prolonged intraperitoneal dexamethasone administration to rats against the fructose diet background is accompanied by the formation of insulin resistance syndrome. Pathological changes in cytokine (decrease of adiponectin, increase of resistin concentrations and IL-6,  $\alpha$ -TNF as well) and hormonal (emergence hypercorticosteronemia) profiles of blood serum are observed under our experimental conditions. It was shown that a 3-weeks administration of the studied drug (based on affinity purified antibodies against endocannabinoid receptor) substantially normalizes mentioned parameters. This is evidenced by the elevated levels of adiponectin, inhibition of resistin production and anti-inflammatory cytokines (IL-6,  $\alpha$ -TNF), decrease of hypercorticosteronemia manifestation. The use of studied drug did not lead to changes of investigated parameters in the healthy animals, which have been keeping on a standard vivarium diet.

KEY WORDS: metabolic syndrome, obesity, adiponectin, resistin, interleukins.

Отримано 14.10.15

Адреса для листування: А. Л. Загайко, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, Харків, 61002, Україна.