

Рекомендована д.м.н., професором С.М.Дрогозов

УДК 616.12-008+616-002-008.953-092+616-092.4

ВПЛИВ КВЕРЦЕТИНУ НА ПРОЗАПАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ МОНОЦИТІВ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ У ЖІНОК З МЕТАБОЛІЧНИМ СИНДРОМОМ У МЕНОПАУЗІ

Л.В.Глушко, А.Х.Насраллах, С.В.Федоров

ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»

Ключові слова: метаболічний синдром; менопауза; моноцити/макрофаги; цитокіни; запалення; кверцетин

THE EFFECT OF QUERCETIN ON THE PROINFLAMMATORY ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES IN WOMEN WITH THE METABOLIC SYNDROME IN MENOPAUSE

L.V.Glushko, A.H.Nasrallah, S.V.Fedorov

Key words: metabolic syndrome; menopause; monocytes/macrophages; cytokines; inflammation; Quercetin

The metabolic syndrome (MetS) is currently considered as a worldwide epidemic as a result of the increased prevalence of obesity and a sedentary lifestyle, and the prevalence of MetS in the adult population is relatively high. Many studies have shown the high prevalence of the metabolic syndrome among postmenopausal women. The aim of our study was to investigate spontaneous cytokines and chemokines production by macrophages in menopausal women with MetS (in vitro) and the possible effect of quercetin. The role of menopausal risk factors in initiating cardiovascular disease remains unclear. Several trials have recently demonstrated that the chronic inflammatory condition associated with MetS is characterized by continuous activation of the innate immune system. The activity of monocytes/macrophages in vitro isolated from menopausal women with MetS blood has been found. The spontaneous macrophage production of interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6), and leukotriene B₄ (Ltr B₄) has been examined. The overproduction of both cytokines and chemokine by macrophages has been revealed: IL-1 β by 1.69 times ($p < 0.05$); IL-6 – by 2.54 times ($p < 0.01$) and Ltr B₄ – by 1.71 times ($p < 0.05$). Some correlations between spontaneous production of IL-1 β and IL-6 ($r = 0.52$, $p < 0.05$), IL-1 β and Ltr B₄ ($r = 0.58$, $p < 0.05$), IL-6 and Ltr B₄ ($r = 0.75$, $p < 0.05$) by macrophages of menopausal women with MetS have been found. Quercetin in vitro normalized IL-1 β , IL-6 and Ltr B₄ production by monocytes/macrophages.

Метаболічний синдром (МС) на теперішній час розглядається як епідемія, яка поширюється в усьому світі у зв'язку з надмірною масою тіла (ожирінням) та малорухомим способом життя дорослого населення. Наявність МС подвоює ризик виникнення кардіоваскулярної патології в наступні 5-10 років та в 3-6 разів підвищує ймовірність виникнення цукрового діабету 2 типу. Додатково зростає ризик смерті внаслідок серцево-судинних захворювань. Згідно з даними Framingham Heart Study, в яке було включено понад 5000 осіб віком 18-74 роки, поєднання трьох і більше компонентів МС збільшує ризик виникнення ішемічної хвороби серця (ІХС) в 2,4 рази у осіб чоловічої статі та в 5,9 разів у жінок [4].

Численні дослідження свідчать про значне зростання випадків МС у жінок у період менопаузи, яке коливається в межах від 32,6% до 41,5% [3]. Питання механізму впливу менопаузи на становлення серцево-судинних захворювань і надалі залишається до кінця незрозумілим. Поряд із зменшенням захисної функції естрогенів розглядається можлива хронічна активація імунної системи (у вигляді хронічного запалення середньої інтенсивності) при МС [7]. Відомо, що запалення обумовлює становлення та прогресування атеросклеротичного ураження артерій. Моноцити/макрофаги – перші запальні клітини, які

проникають у ділянку атеросклеротичного ураження та є основним компонентом атеросклеротичної бляшки [3]. Прозапальні цитокіни та хемокіни, що продукуються макрофагами, стимулюють утворення молекул адгезії, протеаз та інших біологічно активних речовин, які потрапляють у системний кровообіг та впливають зокрема і на процеси атерогенезу [7]. Кверцетин (3,3',4',5,7-пентагідроксифлавонол), член родини біофлавоноїдів є одним із найбільш поширених компонентів їжі, який міститься в овочах, фруктах, чаї та вині [6]. Численні дослідження показали позитивний вплив на стан серцево-судинної системи. Кверцетин позиціонується як речовина з проти-запальними, протиатеросклеротичними, антикоагулянтними та антигіпертензивними властивостями [6]. Окрім того, він володіє потужним антиоксидантним ефектом. Такий антиоксидантний фармакологічний ефект частіше асоціюють із серцево-судинними захворюваннями, оскільки модифіковані ліпопротеїди низької густини слугують пусковим фактором у ініціації атеросклерозу [6]. В той же час практично відсутні дані щодо впливу кверцетину на продукцію моноцитами/макрофагами периферійної крові ряду цитокінів та хемокінів у хворих із МС в умовах *in vitro*.

Метою дослідження було вивчення спонтанної продукції моноцитами/макрофагами в жінок із МС

Таблиця

Спонтанна продукція цитокінів та хемокінів моноцитами/макрофагами в умовах *in vitro*

Показник	Жінки в менопаузі з МС, n=18	Контрольна група, n=16	Достовірність
ІЛ-1 β , пг/10 ⁶ кл.	93,50 \pm 15,30	55,45 \pm 9,54	p<0,05
ІЛ-6, пг/10 ⁶ кл.	6,76 \pm 0,77	2,66 \pm 0,26	p<0,01
Лтр В ₄ , пг/10 ⁶ кл.	6,71 \pm 0,94	3,93 \pm 0,79	p<0,05

в період менопаузи ряду цитокінів і хемокінів та можливий вплив кверцетину.

Матеріали та методи

Дослідження було проведене відповідно до вимог Хельсінської декларації та рекомендацій із належної клінічної практики. Усі обстежені особи підписали інформовану згоду; дослідження було затверджене локальним комітетом з біоетики. Обстежено 18 жінок у менопаузі з МС. Контрольну групу склали 16 практично здорових осіб. З метою отримання суспензії моноцитів використовувався метод H.Recalde [10]. Чистота суспензії моноцитів (89-96%) підтверджена імунофлуоресцентним методом із використанням моноклональних анти-CD14 антитіл (Daco, Glostrup, Denmark). Життєздатність клітин у суспензії була підтверджена тестом із трипановим синім [1] і складала 89-93%. Після перерахунку та розподілу (1 \times 10⁶ клітин на лунку) проводили інкубацію моноцитів у середовищі 199, що містило 30% ауосироватку крові, інактивовану в термостаті при температурі 56 $^{\circ}$ C протягом 2-х годин, 100 ОД/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину та 10 мкг/мл фунгізону (Gibco, Grand Island, NY, USA) в 24-лункових пластикових кластерах для тканинних культур (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) протягом доби при температурі 37 $^{\circ}$ C в атмосфері 5% вуглекислого газу + 95% атмосферного повітря [2]. Після інкубації супернатант обережно відбирали та заморожували при температурі -80 $^{\circ}$ C до наступного визначення базальної продукції цитокінів та хемокінів. До середовища додатково додавали кверцетин, попередньо розчинений у фізіологічному розчині хлориду натрію, в кількості 0,517 мг/мл, що відповідає в перерахунку максимальній концентрації ліків у крові. В якості плацебо використовували 0,9% розчин натрію хлориду. Повторно інкубували впродовж доби. Титри цитокінів у супернатанті визначали методом імуноферментного аналізу на аналізаторі «Stat Fax 303 Plus» (США) за допомогою наборів реагентів «ProCon IL-1 β », «ProCon IL-6» (ООО «Протеиновый контур», Росія); лейкотрієну В₄ – використовуючи набір реагентів «Biotrak Ltr В₄ EIA System» (Amersham Pharmacia Biotech, Великобританія).

Статистичний аналіз проводили із використанням стандартного пакету програм Statistica 6.1 (Stat-Soft, Tulsa, OK, USA).

Результати та їх обговорення

У обстежених жінок із метаболічним синдромом в менопаузі спостерігається надмірна активація моноцитів/макрофагів, про що свідчить достовірно вища спонтанна продукція цими клітинами в умовах *in vitro*

ІЛ-1 β : 93,50 \pm 15,30 пг/10⁶ кл. проти 55,45 \pm 9,54 пг/10⁶ кл. в групі контролю (p<0,05); ІЛ-6: 6,76 \pm 0,77 пг/10⁶ кл. проти 2,66 \pm 0,26 пг/10⁶ кл. (p<0,01) та Лтр В₄: 6,71 \pm 0,94 пг/10⁶ кл. проти 3,93 \pm 0,79 пг/10⁶ кл. (p<0,05) (табл.). Між рівнями спонтанної продукції ІЛ-1 β та ІЛ-6, ІЛ-1 β та Лтр В₄ моноцитами/макрофагами обстежених жінок із МС відмічений середньої сили прямий кореляційний зв'язок (r=0,52, p<0,05; r=0,58, p<0,05); між концентрацією в супернатанті ІЛ-6 та Лтр В₄ – сильний прямий кореляційний зв'язок (r=0,75, p<0,05).

Відомо, що під дією макрофагального колонієстимулюючого фактора (М-КСФ) та інших диференціюючих факторів моноцити диференціюються у 2 важливі типи макрофагів та/чи дендритних клітин [5, 9]. М1 та М2 макрофаги відіграють протилежну роль у процесі запалення, але обидва представлені у атеросклеротичній бляшці. М1 макрофаги, які походять від ЛубС^{high} моноцитів, є промоторами запалення, класично активуються ліпополісахаридом у присутності інтерферону- γ , продукують у великій кількості ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-2, ІЛ-23, фактор некрозу пухлин- α тощо. На противагу цьому М2 макрофаги утворюються з ЛубС^{low} моноцитів та сприяють усуненню запалення, продукують значну кількість проти-запального цитокіну ІЛ-10, а також забезпечують експресію скавенджер-рецепторів та рецепторів до маннози і аргінази [8].

Лтр В₄ – ліпідний медіатор із вираженими хемоатрактивними властивостями, який синтезується рядом імунокомпетентних клітин (нейтрофілами, макрофагами, повновидними клітинами тощо). Підвищені рівні зазначеного хемокіну виявляються при запальних захворюваннях, атеросклерозі.

Встановлено, що під дією кверцетину відмічається значне зниження рівнів спонтанної продукції досліджуваних цитокінів та хемокінів моноцитами/макрофагами, виділених у жінок в менопаузі із МС. Зокрема, концентрація ІЛ-1 β в надосадовій рідині зменшилась до 44,93 \pm 8,59 пг/10⁶ кл. (p<0,05), ІЛ-6 – до 4,99 \pm 0,64 пг/10⁶ кл. (p<0,001), Лтр В₄ – до 3,18 \pm 0,33 пг/10⁶ кл. (p<0,001).

ВИСНОВКИ

Таким чином, моноцити/макрофаги, виділені з периферійної крові жінок із МС, які перебувають в менопаузі, є в стані хронічної активації, яка слугує стимулом запального процесу на етапах становлення та прогресування атеросклерозу. Кверцетин в умовах *in vitro* нормалізує продукцію макрофагами ІЛ-1 β , ІЛ-6 та Лтр В₄.

Перспективою наступних досліджень буде пошук нових шляхів терапевтичного впливу на моноцити з метою попередження їх активації при МС.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: Справ. / Под ред. В.В.Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 366 с.*
2. *Фреини Р. Культура животных клеток: Методы / Под ред. Р.Фреини. Пер. с англ. – М.: Мир, 1989. – 332 с.*
3. *Ding Q.F., Hayashi T., Zhang X. J. // J. of Diabetes and its Complications. – 2007. – Vol. 21, №5. – P. 315-319.*
4. *Effects of lifestyle modification on metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis / K.Yamaoka, T.Tango // BMC Medicine. – 2012. – Vol. 10. – P. 138. [Electronic resource] Access to magazine: <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/10/138>*
5. *Johnson J.L., Newby A.C. // Current Opinion in Lipidol. – 2009. – Vol. 20, №5. – P. 370-378.*
6. *Keisuke Ishizawa, Masanori Yoshizumi, Yoshichika Kawai et al. // J. of Pharmacol. Sci. – 2011. – Vol. 115. – P. 466-470.*
7. *Lloyd-Jones D., Adams R., Carnethon M. // Circulation. – 2009. – Vol. 119, №3. – P. 480-486.*
8. *Mantovani A., Garlanda C., Locati M. // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biol. – 2009. – Vol. 29, №10. – P. 1419-1423.*
9. *Paulson K.E., Zhu S.N., Chen M. et al. // Circulation Res. – 2010. – Vol. 106, №2. – P. 383-390.*
10. *Recalde H.R. // J. Immunol. Meth. – 1984. – Vol. 69. – P. 71-77.*

ВПЛИВ КВЕРЦЕТИНУ НА ПРОЗАПАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ МОНОЦИТІВ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ У ЖІНОК З МЕТАБОЛІЧНИМ СИНДРОМОМ У МЕНОПАУЗІ**Л.В.Глушко, А.Х.Насраллах, С.В.Федоров****Ключові слова:** метаболічний синдром; менопауза; моноцити/макрофаги; цитокіни; запалення; кверцетин

Метаболічний синдром (МС) на теперішній час розглядається як епідемія, яка поширюється в усьому світі у зв'язку з надмірною масою тіла (ожирінням) та малорухомим способом життя дорослого населення. МС створює значний додатковий тягар на ризик несприятливих кардіоваскулярних подій. МС у жінок частіше трапляється в період менопаузи. Метою дослідження було вивчення спонтанної продукції моноцитами/макрофагами у жінок із МС в період менопаузи ряду цитокінів і хемокинів та можливий вплив кверцетину. В умовах *in vitro* досліджували спонтанну продукцію моноцитами/макрофагами інтерлейкінів-1 β , -6 та лейкотриєну V_4 , виділеними у жінок з МС в менопаузі, а також за умови впливу кверцетину. У обстежених жінок із метаболічним синдромом в менопаузі на противагу здоровим особам спостерігається надмірна активація моноцитів/макрофагів, про що свідчить достовірно вища спонтанна продукція цими клітинами в умовах *in vitro* ІЛ-1 β – в 1,69 рази ($p < 0,05$); ІЛ-6 – в 2,54 рази ($p < 0,01$) та Лтр V_4 – в 1,71 рази ($p < 0,05$). Між рівнями спонтанної продукції ІЛ-1 β та ІЛ-6, ІЛ-1 β та Лтр V_4 моноцитами/макрофагами обстежених жінок із МС відмічений середньої сили прямий кореляційний зв'язок ($r = 0,52$, $p < 0,05$; $r = 0,58$, $p < 0,05$); між концентрацією в супернатанті ІЛ-6 та Лтр V_4 – сильний прямий кореляційний зв'язок ($r = 0,75$, $p < 0,05$). Встановлено, що під дією кверцетину відмічається значне зниження рівнів спонтанної продукції досліджуваних цитокінів та хемокинів моноцитами/макрофагами, виділених у жінок в менопаузі із МС.

ВЛИЯНИЕ КВЕРЦЕТИНА НА ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ЖЕНЩИН С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ В МЕНОПАУЗЕ**Л.В.Глушко, А.Х. Насраллах, С.В. Федоров****Ключевые слова:** метаболічний синдром; менопауза; моноцити/макрофаги; цитокіни; запалення; кверцетин

Метаболічний синдром (МС) сьогодні розглядається як епідемія, яка розповсюджується по всьому світу в зв'язку з збільшенням кількості людей з ожирінням і сидячим образом життя середі дорослої популяції. МС додатково впливає на розвиток небажаних серцево-судинних подій. У жінок МС частіше розвивається в період менопаузи. Цілью цього дослідження було вивчення рівня спонтанної продукції цитокінів і хемокинів моноцитами/макрофагами периферическої крові в умовах *in vitro* і можливе вплив кверцетина. В умовах *in vitro* визначали спонтанну продукцію моноцитами/макрофагами інтерлейкінів-1 β , -6 та лейкотриєну V_4 , виділених у жінок з МС в менопаузі, а також при додатковій інкубації кліток кверцетином. У обстежених жінок з МС в період менопаузи (в порівнянні з здоровими людьми) відзначається хронічна активація моноцитів/макрофагів, що проявлялось збільшеною спонтанною продукцією цими клітинами в умовах *in vitro* ІЛ-1 β – в 1,69 рази ($p < 0,05$); ІЛ-6 – в 2,54 рази ($p < 0,01$) та Лтр V_4 – в 1,71 рази ($p < 0,05$). Між показателями спонтанної продукції ІЛ-1 β та ІЛ-6, ІЛ-1 β та Лтр V_4 моноцитами/макрофагами відмічена середньої сили пряма кореляційна зв'язок ($r = 0,52$, $p < 0,05$; $r = 0,58$, $p < 0,05$), а між концентрацією в супернатанті ІЛ-6 та Лтр V_4 – сильна пряма кореляційна зв'язок ($r = 0,75$, $p < 0,05$). Відмічено, що під впливом кверцетина значно зменшується спонтанна продукція цитокінів і хемокинів, що підтверджує протизапальний ефект біофлавоноїда.