

Вплив антиестрогенних препаратів на розвиток алергічного риніту в експерименті

С.Е. ЯРЕМЧУК, А.Ф. КАРАСЬ, М.Д. ТИМЧЕНКО

/ДУ «Інститут отоларингології імені професора О.С. Коломійченка», Київ/

Резюме

Влияние антиэстрогенных препаратов на развитие аллергического ринита в эксперименте

С.Э. Яремчук, А.Ф. Карась, М.Д. Тимченко

В результате проведенных исследований о применении тамоксифена в эксперименте на крысах, подвергшихся алергизации, выявлено его позитивное влияние на слизистую оболочку полости носа. Полученные результаты являются базисом для нового подхода к лечению аллергического ринита с использованием антагонистов эстрогеновых рецепторов.

Ключевые слова: антиэстрогеновые препараты, аллергический ринит

Summary

The Influents of Antiestrogens Drugs for Development Allergic Rhinitis in the Experiment

S.E. Yaremchuk, A.F. Karas, M.D. Tymchenko

As result of our animal (rat) experiment of apply of tamoxifen for treatment allergic pathology we revealed it positive influent for nasal mucosa. Our results are ground for new approach for treatment of allergic pathology with use of antagonist of estrogen receptors.

Key words: antiestrogen therapy drugs, allergic rhinitis

Починаючи з 1986 року, коли вперше були описані естрогенові рецептори в різних органах і системах, почалося їхнє активне вивчення. У зв'язку з цим активно розвивається і знаходить численні підтвердження концепція, згідно з котрою вплив статевих стероїдів у тій чи іншій мірі поширюється на функціональний стан всіх органів і систем, у тому числі і респіраторного тракту [2, 8]. В даний час встановлено наявність мембранних рецепторів у печінці, м'язах, підшлунковій залозі, деяких структурах головного мозку, кістковій тканині, а також серцево-судинній і дихальній системах. [3, 4, 7, 9–12] Таким чином, наявність рецепторів до статевих гормонів в органах нерепродуктивної сфери доводить різноманіття їхньої біологічної активності як системних регуляторів фізіологічних процесів на рівні цілого організму. У зв'язку з цим з'явилися нові аспекти впливу на перебіг різних захворювань шляхом фармакотерапевтичної стимуляції естрогенових рецепторів, що знаходяться в різних тканинах організму (табл. 1) [6].

Основними ефектами естрогенів в організмі є синтез різних білків і ростових факторів *de novo*, гіпер- і метаплазія епітелію, гіперфункція і зростання залоз. Враховуючи той факт, що при розвитку алергічного риніту (АР) мають місце всі наведені вище явища, а рецептори естрогенів виявлені в порожнині носа, певну цікавість викликає дослідження впливу препаратів із антиестрогенними властивостями, що здатні блокувати естрогенові рецептори.

У 1986 році Є.В. Парфьонова вперше показала наявність рецепторів до жіночих статевих гормонів у слизовій оболонці порожнини носа у щурів, причому вони повністю відповідали таким у матці, а їхня кількість не залежала від статі тварини [2]. В літературі представлено дані про наявність естрогенових рецепторів у тучних клітинах та їхню роль у розвитку алергічних реакцій [11]. Крім того, була виявлена залежність між підвищенням рівня естро-

генів і розвитком імунних порушень, котрі значно підвищують ризик розвитку запальних, алергічних та аутоімунних захворювань [6].

Метою даної роботи стала розробка нового методу лікування АР із застосуванням препарату, здатного на ранніх етапах блокувати процес алергічного запалення, усунути його прояви, не впливаючи при цьому згубно на стан слизової оболонки носової порожнини.

Матеріали та методи дослідження

Об'єктом дослідження стали 35 білих нелінійних щурів-самців місячного віку з масою тіла на початку дослідження 150 ± 20 г. Тварини утримувалися у виварії у стандартних клітках із непрозорими стінками та підлогою з білого пластику та ґратчастим залізним верхом. Кількість щурів у клітці – від чотирьох до шести. Режим освітлення у виварії був природним. Тварини отримували стандарт-

Таблиця 1. Нові можливості фармакотерапевтичного впливу при лікуванні різноманітних патологій

Тканини-мішені	Естрогенові рецептори (ER)	Хвороби	Фармакологічна дія
Кісткова тканина	ER α	Остеопороз	ER α агоністи
Мозкова тканина	ER α ER β	Інсульт, ожиріння, деменція	ER α антагоністи ER β агоністи
Симпатичні ганглії	ER β	Гіпертензія	ER β агоністи
Пряма кишка	ER β	Рак прямої кишки	ER β агоністи
Кістковий мозок	ER β	Лейкемія	ER β агоністи

ний харчовий раціон (комбікорм для лабораторних щурів) й мали вільний доступ до води та їжі. Всі експерименти проводились відповідно до існуючих національних та міжнародних вимог та норм використання експериментальних тварин [1, 5].

Тварини, що брали участь у досліді, були поділені на дві групи, по 15 у кожній. П'ять тварин, яким не проводилася алергізація, склали групу порівняння. У порожнину носа після попереднього введення 0,1% розчину поліглюкіну (інтервал між введеннями становив 30 хв) їм вводився розчин амброзії в розведенні 1:10000. Процедура виконувалася 6 разів із інтервалом 4 дні. Починаючи з 16-го дня від початку експерименту, тваринам, що входили в основну групу, в порожнину носа через 30 хвилин після введення розчину пилку амброзії вводився 0,1 мл розчину тамоксифену в концентрації 10 мг/мл. Механізм антиестрогенової дії даного лікарського препарату пов'язаний з його здатністю конкурентно блокувати специфічні естрогенові рецептори органів-мішеней. Впродовж експерименту порожнина носа тварин промивалася ізотонічним сольовим розчином і вивчалися змиви промивних вод. На 4-й день після останнього введення препаратів тварини були декапітовані, після чого було виконано морфологічне дослідження слизової оболонки порожнини носа щурів основної і контрольної групи. Для морфологічних досліджень брали ділянки нюхового епітелію і фіксували їх у розчині формаліну з 10% концентрацією. Після того зразки заливали у парафін. У подальшому з використанням санного мікротому виготовляли парафінові зрізи товщиною 5 мкм. Зрізи фарбували залізним гематоксилином та гематоксилином Бемера-еозином. За допомогою морфометричної установки, котра складалася з мікроскопу Primo Star (Carl Zeiss) та цифрової фотокамери Tусеп робили цифрові мікрофотографії зрізів. На отриманих мікрофотографіях за допомогою морфометричної комп'ютерної програми Image J вимірювали площу перерізу ядер вільчастих клітин, площу перерізу келихоподібних слизових клітин і висоту нюхового епітелію. Обробку отриманих даних проводили шляхом порівняння кожного виміряного параметра всіх дослідних груп із контрольною. Кров тварин досліджуваних груп, а також кров інтактної тварини, що не брала участь в експерименті, досліджувалися на вміст специфічного імуноглобуліну Е (реакція розеткоутворення).

Дослідження промивної рідини порожнини носа щурів проводилося за такою методикою: у порожнину носа досліджуваної тварини за допомогою мікропіпетки вводили 1 мл фізіологічного розчину і негайно його відсмоктували. Отриману рідину центри-

фугували протягом 10 хвилин. Осад наносився на скло, висушувався і фарбувався гематоксилином-еозином. Кількість клітин підраховувалася за допомогою гемоцитометра.

Слизова оболонка порожнини носа щура забарвлювалася толуїдиновим – синім, для виявлення гепарино-кислого сульфатованого мукополісахариду, що є основним цитоплазматичним включенням тканинних базофілів. Вміст тучних клітин у слизовій оболонці носа розраховували в 1 кв. мм (в 10 полях зору). Визначали коефіцієнт дегрануляції, величину профільного поля, середній рівень кількості клітин. Отримані дані оброблялися статистичним методом Стюдента. Визначалися середні й відносні величини, проводилася їхня оцінка за допомогою похибки (m), суттєвість розходжень за допомогою коефіцієнта Стюдента (t) і вірогідність відмінності порівнюваних груп визначалася через Р – ймовірність безпомилкового прогнозу.

Результати та їх обговорення

З метою об'єктивізації наявності алергічного процесу у крові досліджуваних тварин виявлено підвищення вмісту специфічного імуноглобуліну Е у 7 разів у порівнянні з інтактною твариною, що не брала участі в експерименті. При гістологічному дослідженні слизової носової порожнини тварин із групи порівняння виявлено вільчасті епітеліоцити (площа перерізу їхніх ядер становила $26,49 \pm 1,07$ мкм²), вставні епітеліоцити та келихоподібні слизові клітини (площа перерізу котрих становила $126,52 \pm 13,00$ мкм²).

При аналізі оболонки порожнини носа тварин контрольної групи виявлено набухання келихоподібних клітин, велика кількість мукоїдної субстанції. Деякі ділянки з вираженими деструктивними змінами миготливого епітелію. Кровоносні судини розширені. Нерідко не тільки навколо них, але і в середині виявлені тканинні базофіли. Фібробласти виявлені в основному веретеноподібні. Кількість макрофагів і плазматичних клітин була незначною. Спостерігалось вірогідне зменшення висоти нюхового епітелію до $27,59 \pm 1,13$ мкм, тобто на 31% порівняно з інтактними тваринами, що свідчить про його часткову атрофію. При цьому також на 29% порівняно з інтактною групою зменшувалася площа перерізу ядер вільчастих клітин. Ядра цих клітин на отриманих мікрофотографіях виглядають темними, гіперхромними. Це свідчить про зниження функціональної активності таких ядер. Водночас площа перерізу слизових келихоподібних клітин мала тенденцію до зростання, але вірогідно не відрізнялася від цього параметру у контрольних тварин.

В основній групі (тварини, котрим додатково вводився розчин тамоксифену) при дослідженні слизової оболонки порожнини носа не спостерігалось настільки значущих змін, котрі були в контрольній групі. Висота нюхового епітелію була не такою зменшеною, як у контрольній групі і складала 89% від значень цього параметру в інтактних тварин. Це може свідчити про певний протекторний ефект. Площа перерізу ядер вільчастих клітин є достовірно нижчою на 14%. Площа перерізу слизових келихоподібних клітин зростає на 30%. Власне, візуально слизова оболонка тварин основної групи наближалася до такої у тварин, що не піддавалися алергізації.

Дані, отримані при дослідженні промивної рідини досліджуваних тварин, відображені в таблиці 2.

Як видно з даних, наведених у таблиці 2, введення тамоксифену блокує розвиток деструктивних процесів у слизовій оболонці порожнини носа щурів в експерименті. Хоча кількість тучних клітин і коефіцієнт дегрануляції і достовірно більша в контрольній групі, проте значно нижча, ніж у групі тварин, що не отримували тамок-

Таблиця 2. Середній рівень кількості тучних клітин, величини профільного поля, коефіцієнт дегрануляції мастоцитів слизової оболонки носа ($M \pm m$)

Показники	Інтактна група	Експериментальний алергічний риніт (контрольна група)	Експериментальний алергічний риніт + тамоксифен (основна група)
Кількість тучних клітин	16±0,9	43±2,3 P<0,001 t – 10,8	33±1,3 P<0,001 t – 10,6
Величина профільного поля	107,5±2,4	291,1±2,4 P<0,001 t – 54,0	222±3,0 P<0,001 t – 30,1
Коефіцієнт дегрануляції	0,3±0,004	0,69±0,005 P<0,001 t – 97,5	0,59±0,002 P<0,001 t – 72,5

Примітки: t – коефіцієнт Стюдента; P – вірогідність прогнозу.

сифен. Отримані дані пояснюють той факт, що тамоксифен завдяки своїм властивостям блокувати дію естрогенових рецепторів перешкоджає дегрануляції мастоцитів і виходу преформованих медіаторів, котрі викликали вищеозначені порушення у слизовій оболонці носової порожнини. Цитограма тварин основної групи містить нейтрофіли, спорадичні еозинофіли і лімфоцити й незначну кількість тучних клітин, тобто виявлені зміни є незначними, на той час як в контрольній групі виявлено велику кількість еозинофілів і тучних клітин. Вищезазначені зміни у складі промивних вод у досліджуваних тварин свідчать про те, що тамоксифен частково блокує розвиток алергічної реакції у слизовій оболонці порожнини носа. Промивні води тварин, що отримували тамоксифен за своїм складом наближаються до таких у групі порівняння.

Висновки

В результаті проведених досліджень, нами виявлено позитивний вплив розчину тамоксифену на слизову оболонку порожнини носа у тварин, що зазнали алергізації. Отримані результати є базисом для початку нового підходу до лікування алергічної патології із застосуванням антагоністів естрогенових рецепторів.

Література

1. Закон України від 21.02.2006 № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» // Відомості Верховної Ради України. – 2006. – № 27. – С. 230.
2. Парфенова Е. В. Связь 3H-эстрадиола с цитозольными рецепторами обонятельной выстилки крыс // Цитология. – 28 (5), 1986. – с. 570–572.
3. Auger A. P. Steroid receptor control of reproductive behavior // *Horm. Behav.* – 2004, Mar; 45 (3): 168–72. Review.
4. Coleman K. M., Smith C. L. Intracellular signaling pathways: nongenomic actions of estrogens and ligand-independent activation of estrogen receptors // *Front. Biosci.* – 2001, Oct; 01; 6:D1379–91. Review.
5. European convention for protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe. – (18.03.1986). – Strasburg, 1986. – 52 p.
6. Helmy A. M., El Ghazzawi I. F., Mandour M. A., Shehata M. A. The effect of estrogen on the nasal respiratory mucosa. An experimental histopatological and histochemical study // *J. Laryngology Otology.* – 1975, Dec; 89 (12): 1229–41.
7. Riggs B.L., Khosla S., Melton L.J. 3rd Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton // *Endocr. Rev.* – 2002. – Jun; 23 (3): 279–302. Review.
8. Saunders P. T., Maguire S. M. Expression of estrogen receptor beta in multiple rat tissues visualized by immunohistochemistry // *Journal of Endocrinology.* – 1997, 154. – R13–16, I001–1008.
9. Venkov C., Rankin A., Vaughan D. Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. A potential mechanism for steroid hormone regulation of endothelial function // *Circulation.* – 1996. – Vol. 94. – p. 727–733.
10. Yang S. H., Liu R., Wu S. S., Simpkins J. W. The use of estrogens and related compounds in the treatment of damage from cerebral ischemia // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2003, Dec; 1007:101–7. Review.
11. Zhao X., Dong Z., Yang Z. An experimental observation on the influence of the different levels of estradiol on the nasal mucosa // *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi.* – 1994, Apr; 29 (2): 98–100.
12. Zhu W., Everson W.V., Smart E.J. Estrogen in cardiovascular disease // *Curr. Opin. Lipidol.* – 2004, Oct; 15 (5): 589–93.