

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ МЕЛАТОНИНА И ДИКЛОФЕНАКА НА НЕКОТОРЫЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Э. Б. Арушанян, С. С. Наумов, В. Н. Иванова, К. В. Ломоносова¹

Эпифизарный гормон мелатонин (1 и 5 мг/кг) и диклофенак (8 мг/кг) при внутривнутрибрюшинном введении существенно ограничивали гематологические показатели воспаления и иммунологической реактивности у крыс с экспериментальным адьювантным артритом. Эффект мелатонина был более выраженным, чем у диклофенака.

Ключевые слова: мелатонин; диклофенак; артрит

ВВЕДЕНИЕ

Гормон мозговой железы эпифиза мелатонин (МТ) обладает многообразными биологическими свойствами и широким спектром фармакологической активности. Это позволяет использовать препараты МТ в клинической практике при лечении самых разных психоневрологических и соматических расстройств [1, 2, 4]. Как свидетельствует проведённый анализ литературных данных, у МТ обнаружено угнетающее влияние на воспалительный процесс [6]. Между тем вопрос о его способности вмешиваться в течение аутоиммунных заболеваний до сих пор остаётся дискуссионным [11, 14].

В связи с этим представлялось актуальным оценить действие МТ на проявления экспериментального ревматоидного артрита у крыс в сравнении с эффектом диклофенака — типичного представителя группы нестероидных противовоспалительных средств.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты выполнены на 25 белых беспородных крысах-самцах, полученных из питомника “Рапполово” РАМН, массой 170 – 200 г, которых содержали в обычных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде. Эксперименты проводили с соблюдением международных принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986).

Предварительно у всех животных моделировали ревматоидный артрит однократной инъекцией под кожу правой задней конечности (субплантарно) 0,1 мл адьюванта Фрейнда (АФ) (“Pierce Biotechnology”, США) [7]. Через 14 сут после этого всех животных разделили на 5 равных групп: контрольную и опытные, которые в течение двух недель получали в идентичном объёме (внутрибрюшинно) инъекции физио-

логического раствора, раствор МТ (мелаксен, “Unipharm”, США) в дозе 1 мг/кг, МТ — 5 мг/кг и диклофенак (“Nemofarm”, Сербия) — 8 мг/кг. Все инъекции проводили в вечернее время (с 19 ч до 20 ч). До начала исследования и на 14 и 28-е сутки из хвостовой вены крыс в вакутейнеры фирмы DNK (Тайвань) с активатором свертываемости забирали кровь (не менее 0,5 мл) в те же вечерние часы.

В образцах крови определяли следующие показатели: С-реактивный белок (методом иммунотурбодиметрии реагентом CRPL3 на биохимическом модуле анализатора Cobas 6000 [12]); число лейкоцитов (автоматически на гематологическом анализаторе Sysmex XT-2000); ревматоидный фактор класса М (методом двухстадийного иммуноферментного анализа реагентом “ДС-ИФА-RF-M” с использованием спектрофотометра ImmunoChem-2100 Microplate Reader при длине волны 450 нм); уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) оценивали с помощью набора реагентов ЦИК-ХЕМА методом иммунного турбодиметрического анализа на том же спектрофотометре [9].

Результаты обрабатывали с использованием парного критерия Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа посредством пакета компьютерных программ BIOSTAT. Различия считали достоверными при $p < 0,05$, в случае $0,05 < p < 0,10$ отличия оценивали как тенденцию.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Здоровые крысы в начале эксперимента демонстрировали обычную для данного вида активность и пищевое поведение. Шерсть была гладкая, блестящая, чистая. Отсутствовали выделения из глаз и ушей. Движения в коленных суставах были свободными и безболезненными.

Инъекции АФ провоцировали у крыс выраженный воспалительный процесс. Уже на 3-и сутки после иммунизации крысы становились вялыми, агрессивными, малоподвижными, шерсть становилась тусклой, взъерошенной, падало потребление корма. При движе-

¹ Ставропольский государственный медицинский университет, 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310.

нии они избегали наступать на больную конечность. К 14-м суткам после иммунизации развивался выраженный отёк мягких тканей стопы и припухлость в области поражённых суставов — межфаланговых, плюснефаланговых, голеностопного и коленного, повышалась локальная температура. Отмечали значительное снижение объёма активных и пассивных движений в опытных коленных суставах и выраженная болезненность при их ощупывании (животное проявляло агрессивность и отдёргивало лапу). Максимальное увеличение окружности правых коленных суставов наблюдали на 2–3-и сутки после введения адьюванта и оно оставалось неизменным до конца эксперимента.

О наличии у животных выраженного воспалительного процесса свидетельствовали значительный лейкоцитоз и резкое увеличение в крови уровня С-реактивного белка (табл. 1). Оба показателя в контрольной серии имели тенденцию к росту в течение 4 нед после введения АФ.

Курсовое применение МТ способствовало уменьшению отека в области опытного сустава, несколько снижалась локальная температура. Животные становились более активными, возрастало потребление корма. Одновременно установлено снижение уровня лейкоцитов и С-реактивного белка в крови животных. Если у животных контрольной группы МТ, вне зависимости от дозы, не влиял на оба показателя, то использованный на фоне сдвигов, вызванных АФ, он существенно их ограничивал. Хотя воспалительный процесс под действием МТ не устранялся полностью, его выраженность достоверно падала. МТ в более высокой дозе (5 мг/кг) вызывал более значительный сдвиг в уровне С-реактивного белка. Под действием диклофенака также установлено ограничение воспалительных проявлений, однако, абсолютная величина возникающих сдвигов со стороны, как лейкоцитоза, так и уровня С-реактивного белка оказалась менее значительной, чем в случае применения МТ.

Сходные данные были получены при оценке действия обоих препаратов по данным иммунного статуса животных (табл. 2). Введение АФ сопровождалось существенным повышением иммунологической реактивности крыс, о чём свидетельствовало нарастание в крови количества ЦИК и уровня ревматоидного фактора. Исходные величины обоих показателей заметно не менялись под влиянием МТ у животных контрольной группы. Однако препарат эпифизарного гормона отчётливо их понижал на фоне адьювантного артрита. Это позволяет констатировать тенденцию к нормализации иммунного статуса. Диклофенак вызывал сходные сдвиги иммунного статуса животных, но в абсолютных величинах его действие отличалось меньшей выраженностью.

Таким образом, представленные факты свидетельствуют о способности МТ ослаблять проявления экспериментального ревматоидного артрита. По некоторым критериям (уровень С-реактивного белка и ЦИК) это действие сильнее проявлялось при использовании более высокой дозы МТ (5 мг/кг). В целом обнаруженные сдвиги имели ту же направленность, что и ответ на диклофенак, выраженность которого по большинству критериев уступала эффекту МТ (табл. 1 и 2).

Полученные сведения, с одной стороны, позволяют рассматривать их в качестве еще одного доказательства существования у естественного гормона МТ универсальной защитной роли в организме, с другой стороны, подчеркивают явные преимущества его препарата, по сравнению с эффектом одного из представителей нестероидных противовоспалительных средств — диклофенака. Это дает право поднимать вопрос о возможности включения МТ в комплексную традиционную терапию ревматоидных заболеваний, разумеется, после проведения адекватных клинических исследований.

В основе установленной антиревматоидной активности МТ, по-видимому, лежат разные клеточные механизмы. Ограничение воспалительных, экссудативных процессов может определяться вмешательством

Таблица 1. Влияние мелатонина и диклофенака на гематологические показатели воспаления у крыс с экспериментальным артритом ($M \pm m$)

Сроки определения	Интактные животные — (АФ)	Контроль (АФ + физ. р-р)	Мелатонин 1 мг/кг	Мелатонин 5 мг/кг	Диклофенак 8 мг/кг
<i>Лейкоциты, $10^9/л$</i>					
Исходные показатели	$4,35 \pm 0,2$	$4,4 \pm 0,3$	$4,42 \pm 0,2$	$4,46 \pm 0,4$	$4,84 \pm 0,4$
Через 14 сут после введения АФ	$31,8 \pm 1,2$	$29,4 \pm 1,8$	$23,2 \pm 1,8$	$25,0 \pm 1,8$	$26,8 \pm 1,7$
Через 28 сут после введения АФ	$31,5 \pm 0,9$	$34,2 \pm 2,4$	$8,75 \pm 0,8^{**}$	$8,7 \pm 0,8^{**}$	$16,65 \pm 0,6^{+}$
<i>С-реактивный белок, мг/л</i>					
Исходные показатели	$0,24 \pm 0,6$	$0,2 \pm 0,07$	$0,18 \pm 0,03$	$0,5 \pm 0,3$	$0,38 \pm 0,1$
Через 14 сут после введения АФ	$33,0 \pm 4,1$	$36,0 \pm 4,5$	$29,8 \pm 3,2$	$31,4 \pm 4,8$	$34,0 \pm 0,5$
Через 28 сут после введения АФ	$35,8 \pm 5,0$	$57,75 \pm 9,1$	$7,94 \pm 1,6^{**}$	$2,5 \pm 1,5^{**}$	$17,82 \pm 2,4^{+}$

Примечание. Здесь и в табл. 2: АФ — адьювант Фрейнда. Различия достоверны по сравнению: + — с группой животных, получавших физиологический раствор (однофакторный дисперсионный анализ при $p < 0,05$), * — с аналогичными параметрами у животных, получавших диклофенак.

Таблица 2. Влияние мелатонина и диклофенака некоторые показатели иммунной системы у крыс с экспериментальным артритом ($M \pm m$)

Сроки определения	Интактные животные — (АФ)	Контроль (АФ + физ. р-р)	Мелатонин 1 мг/кг	Мелатонин 5 мг/кг	Диклофенак 8 мг/кг
<i>Циркулирующие иммунные комплексы, ЕД</i>					
Исходные показатели	20,0 ± 4,1	28,0 ± 6,4	41,6 ± 9,2	51,0 ± 8,4 ⁺	36,0 ± 11,7
Через 14 сут после введения АФ	80,0 ± 7,2	76,7 ± 11,7	85,8 ± 6,1	106,8 ± 13,0	107,2 ± 37,6
Через 28 сут после введения АФ	116,6 ± 24,6	126,8 ± 33,8	45,2 ± 9,0 ⁺	24,2 ± 10,7 ⁺	60,0 ± 6,7
<i>Ревматоидный фактор, МЕ/мл</i>					
Исходные показатели	19,0 ± 2,1	19,5 ± 3,7	19,7 ± 4,0	15,5 ± 2,2	16,9 ± 1,7
Через 14 сут после введения АФ	35,8 ± 2,2	38,5 ± 2,07	74,0 ± 6,6	43,8 ± 4,3	50,1 ± 5,4
Через 28 сут после введения АФ	44,2 ± 2,9	45,1 ± 2,1	32,0 ± 6,7 ⁺ *	30,8 ± 5,0 ⁺ *	57,3 ± 6,9

МТ и его метаболитов в судьбу простагландинов за счёт избирательного подавления активности циклооксигеназы-2 [13]. При воспалительных реакциях аутоиммунного происхождения в протекторном действии МТ важное значение, имеет его разноплановое влияние на иммунную систему. Например, МТ оказывает иммунодепрессивное действие на фоне повышенной продукции лейкоцитов и цитокинов [5, 8, 10]. В антиревматоидном эффекте МТ существенное место принадлежит его антиоксидантным свойствам [3].

Несмотря на очевидность представленных фактов, говорить об их клинической востребованности, по нашему мнению, преждевременно. Необходимо дальнейшее углублённое изучение способности МТ вмешиваться в течение различных аутоиммунных патологических процессов не только в эксперименте, но и в клинических исследованиях в условиях эпифизарной гипо- и гиперактивности.

ВЫВОДЫ

1. Мелатонин (1 и 5 мг/кг, внутривентриально, 14 сут) на модели экспериментального адьювантного артрита у крыс обнаружил противовоспалительные свойства (снижение лейкоцитоза в 3,9 раз, $p < 0,05$ и снижения уровня плазменного С-реактивного белка в 7,1 и 22,8 раза, $p < 0,05$). Его действие совпадало с эффектом диклофенака, но проявлялось сильнее.

2. Мелатонин (1 и 5 мг/кг, внутривентриально, 14 сут) ослаблял иммунологическую реактивность у крыс с экспериментальным адьювантным артритом (уменьшение числа циркулирующих иммунных комплексов в

2,8 – 5,2 раза, $p < 0,05$ и понижение уровня ревматоидного фактора в 1,4 раза, $p < 0,05$). Под влиянием диклофенака в иммунном статусе животных показаны менее существенные сдвиги.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. Н. Анисимов, *Мелатонин: роль в организме, применение в клинике. Система*, Санкт-Петербург (2007).
2. Э. Б. Арушанян, *Уникальный мелатонин*, Ставропольское книжное издательство, Ставрополь (2006).
3. Э. Б. Арушанян, *Экспер. и клин. фармакол.*, **75**(5), 44 – 49 (2012).
4. Э. Б. Арушанян, *Клин. мед.*, № 2, 4 – 8 (2013).
5. Э. Б. Арушанян, Э. В. Бейер, *Экспер. и клин. фармакол.*, **65**(5), 73 – 80 (2002).
6. Э. Б. Арушанян, С. С. Наумов, *Клин. мед.*, № 7, 18 – 22 (2013).
7. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Р. У. Хабриев (ред.), Медицина, Москва (2005).
8. A. Carrillo-Vico, P. J. Lardone, N. Alvarez-Sanchez, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **14**(5), 8638 – 883? (2013).
9. *Clinical Guide to Laboratory Tests*, Ed. A. N. Wu, Sonders Comp. (2006).
10. C. Csabo, *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, **60**(2), 77 – 91 (2013).
11. M. Cutolo, *Curr. Opin. Rheumatol.*, **24**(3), 312 – 318 (2012).
12. H. Greiling, A. M. Gressner (eds.) *Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie*, Stuttgart-New York (1995).
13. M. F. McCarty, *Med. Hypothesis*, **78**(3), 45 – 57 (2012).
14. S. S. Nah, H. J. Won, H. J. Park, et al., *J. Pineal Res.*, **47**(4), 70 – 74 (2009).

Поступила 00.11.13

COMPARATIVE STUDY OF THE INFLUENCE OF MELATONIN AND DICLOFENAC ON SOME HEMATOLOGIC INDICES OF EXPERIMENTAL RHEUMATOID ARTHRITIS IN RATS

E. B. Arushanyan, S. S. Naumov, V. N. Ivanova, and K. V. Lomonosova

Stavropol State Medical University, ul. Mira 310, Stavropol, 355017, Russia

Pineal hormone melatonin (1 and 5 mg/kg) and diclofenac (8 mg/kg) significantly limited hematologic indices of inflammation and immunologic reactivity in rats with experimental adjuvant arthritis. The effect of melatonin was more pronounced than that of diclofenac.

Keywords: melatonin; diclofenac; arthritis