

УДК: 579.61

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МЕЛАТОНИНА ПРИ КАРРАГЕНИНОВОМ ОТЕКЕ ЛАПЫ У КРЫС

Русских И.С.¹, Черемных А.И.¹

¹ ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. Акад. Е.А.Вагнера Минздрава России, Пермь, Россия

(614000, Пермь, ул.Петропавловская, 26), email: russkikh.irina2015@yandex.ru

Русских И.С. (Russkikh I.S.) – студентка стоматологического факультета ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. Акад. Е.А.Вагнера» Минздрава России

Черемных А.И. (Cheremnykh A.I.) – студентка стоматологического факультета ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. Акад. Е.А.Вагнера» Минздрава России

Для корреспонденции: Русских Ирина Сергеевна, 614000, Пермь, ул. Петропавловская, 26, email: russkikh.irina2015@yandex.ru, тел: 89617480731

Специальность 14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология.

Впервые в 1958 г. Арон Лернер из Йельского университета (США) выделил из эпифиза быка, изучил и описал структуру мелатонина (N-ацетил-5-метокситриптамин). Эта биологически важная молекула впоследствии была найдена в сетчатке глаза, клетках костного мозга, кишечника и кожи. Существует ряд клинических и экспериментальных данных о влиянии мелатонина на различные патологические состояния, связанные с воспалением. Среди них воспалительные поражения суставов, внутренних органов (например, язвенный колит), периферических нервов. Следует сразу подчеркнуть, что такие факты не всегда однозначно указывают на клиническую эффективность препарата. Целью нашего исследования стало определение противовоспалительной активности мелатонина на модели «каррагенинового» отека лапы у крыс. Острую воспалительную реакцию (отек) воспроизводили субплантарным (под подошвенный или плантарный апоневроз) введением 0,1 мл 1% раствора каррагенина (сульфатированный полисахарид из ирландского морского мха). Выраженность воспалительной реакции оценивали через 3, 12 часов после индукции воспаления по изменению объема лапы (онкометрически). Исследуемые вещества наносили на лапы крыс в виде мази. Противовоспалительный эффект, оцениваемый по уменьшению отека, выражали в процентах по отношению к контролю. По результатам исследования на основании данных онкометрических измерений при индукции «каррагенинового» отека лап у крыс показано, что мелатонин обладает выраженным противовоспалительным действием.

Ключевые слова: мелатонин, воспаление, клиническое исследование, каррагениновый отек, противовоспалительный эффект

STUDY OF ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF MELATONIN IN CARRAGEENAN PAW EDEMA IN RATS

Russkikh I.S.¹, Cheremnykh A.I.¹

¹ Acad. E.A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia

For the first time in 1958, Aron Lerner from Yale University (USA) isolated from the bull's epiphysis, studied and described the structure of melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine). This biologically important molecule was subsequently found in the retina of the eye, bone marrow cells, intestines, and skin. There are a number of clinical and experimental data on the effect of melatonin on various pathological conditions associated with inflammation. These include inflammatory lesions of the joints, internal organs (for example, ulcerative colitis), and peripheral nerves. It should be emphasized at once that such facts do not always clearly indicate the clinical effectiveness of the drug. The aim of our study was to determine the anti-inflammatory activity of melatonin on the model of "carrageenan" paw edema in rats. Acute inflammatory reaction (edema) was reproduced by subplantar (under plantar or plantar aponeurosis) administration of 0.1 ml of 1% carrageenan solution (sulfated polysaccharide from Irish sea moss). The severity of the inflammatory reaction was evaluated 3, 12 hours after the induction of inflammation by changing the volume of the paw (oncometrically). The studied substances were applied to the paws of rats in the form of ointment. The anti-inflammatory effect, estimated by the reduction of edema, was expressed as a percentage in relation to the control. According to the results of the study based on the data of oncometric measurements during the induction of "carrageenan" paw edema in rats, it was shown that melatonin has a pronounced anti-inflammatory effect.

Key words: melatonin, inflammation, clinical study, carrageenan edema, anti-inflammatory effect

Впервые в 1958 г. Арон Лернер из Йельского университета (США) выделил из эпифиза быка, изучил и описал структуру мелатонина (N-ацетил-5-метокситриптамиин) (рис.1). Эта биологически важная молекула впоследствии была найдена в сетчатке глаза, клетках костного мозга, кишечника и кожи. Изначально мелатонин считался гормоном, участвующим в синхронизации механизмов циркадного ритма в организме.

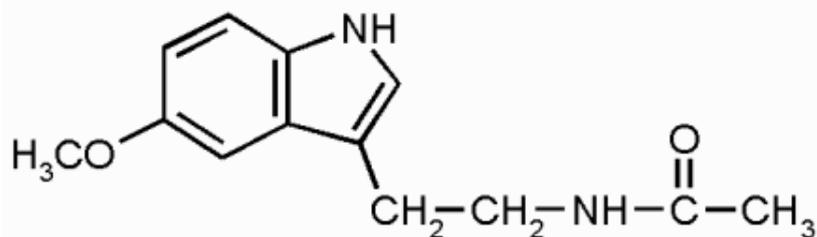


Рис.1 Структурная формула мелатонина

Позже было установлено, что кроме этой гормональной функции он принимает участие в регуляции сезонного и лунного циклов у животных и человека. Кроме того, он является тканевым фактором и одним из самых мощных и доступных эндогенных антиоксидантов и регуляторов иммунной системы. Если учесть, что мелатонин синтезируется также лимфоцитами, а рецепторы мелатонина найдены в мембранах тимоцитов, это дополнительно свидетельствует о значительном влиянии на функцию иммунной системы [5].

В организме человека мелатонин принимает участие в формировании многих патологических событий, включая канцерогенез и старение, когда отмечается снижение уровня данного гормона. Кроме того, уровень мелатонина в крови снижен у хронических курильщиков и у людей с повышенным индексом массы тела.

Свойства мелатонина:

- снижается температура тела;
- уменьшается уровень стрессовых гормонов и эмоциональное напряжение;
- возникает сонливость, наступает сон;
- падает давление крови, замедляется ритм сердечных сокращений;
- расслабляются мышцы;
- тормозится работа органов пищеварения и половой системы;
- восстанавливаются обменные процессы в головном мозге, происходит обработка информации, полученной за день.

Концентрация гормона достигает максимума к полуночи, держится на высоком уровне до 5 часов утра. Максимальные показатели гормона в детском возрасте, затем в период полового созревания они снижаются и вновь возрастают у молодых людей 20-23 лет. После 50 лет начинается прогрессивное уменьшение синтеза гормона и к 65 годам его в крови содержится на 20% меньше, чем у 45-летних [1].

Локальная мелатонинергическая система обнаружена в коже животных и человека. Мелатонин кожи участвует в процессах роста и пигментации волос, защищает клетки от воздействия ультрафиолета и других экзогенных и эндогенных повреждающих факторов.

Созданный в качестве фармакологического препарата мелатонин обнаружил необычайно широкий диапазон лечебных возможностей, которые оказались востребованы при различных патологических состояниях головного мозга и внутренних органов. Многие из них (церебральный отек, поражения желудочно-кишечного тракта, болевой синдром и др.) неизменно сопровождается воспалением, ограничение которого могло бы служить одной из целей терапевтического воздействия мелатонина. Это обстоятельство побудило обобщить факты, свидетельствующие о наличии у мелатонина противовоспалительных свойств, а также изучить данные свойства в ходе эксперимента [3].

Противовоспалительные возможности мелатонина

Способность мелатонина ограничивать воспалительный процесс определяется, по-видимому, совокупностью механизмов, имеющих как регионарное, так и системное происхождение. К числу местных факторов можно отнести прямое влияние мелатонина на отдельные компоненты воспалительной реакции, изменение иммунной реактивности и ограничение оксидантного стресса.

Одним из важнейших элементов антиэкссудативного действия мелатонина следует признать его вмешательство в каскад арахидоновой кислоты с нарушением синтеза простагландинов. Этот факт был установлен в опытах *in vitro* еще в начале 80-х годов прошлого века. Уже тогда обращалось внимание, с одной стороны, на сходство ингибиторных эффектов мелатонина и индометацина, а с другой – на вероятность их реализации в мозговой ткани (медиобазальном гипоталамусе) крыс [3,4].

Позднее на модели провоцируемой липосахаридом гипертермии и активации макрофагов было показано, что противовоспалительная активность мелатонина не зависит от

непосредственного влияния на простогландиновые рецепторы, но определяется угнетением функции фермента циклооксигеназы (ЦОГ), индуцибельная изоформа которой – ЦОГ-2, являясь ключевым этапом в биосинтезе простогландинов, играет, как известно, критическую роль в воспалительном ответе при разных формах патологии.

Синтез индольного соединения мелатонина в секреторных клетках шишковидной железы - пинеалоцитах - происходит в несколько этапов. Исходным звеном является триптофан, который через серотонин и N-ацетилсеротонин превращается в конечный гормон. Ключевыми ферментами синтеза являются N-ацетилтрансфераза и гидроксииндол-О-метилтрансфераза. Образующийся мелатонин секретируется главным образом в спинномозговой жидкости, из которой он попадает в сосудистое русло, а затем переносится по всему организму кровотоком. В структурах головного мозга и периферических органах действие гормона осуществляется через специфические рецепторы (в основном, типов MT1 и MT2) [5].

Показательно, что образование эпифизарного мелатонина, вне в зависимости от видовых особенностей животных, максимально выражено в темноте и минимально на свету. Это обстоятельство дает основание рассматривать шишковидную железу как важную хронотропную железу, которая благодаря тесным морфофункциональным связям с драйвером циркадного ритма - супрахтмическими ядрами гипоталамуса - циркадными колебаниями различных физиологических функций. Учитывая факт преобладающей секреции мелатонина в темноте, они стали приписывать непосредственный интерес формированию цикла сна-бодрствования. В результате мелатонин приобрел репутацию естественного организатора биологических ритмов - хронобиотика и природного гипногенного агента.

В 70-е годы минувшего века иммуногистохимическая техника позволила установить наличие наряду с эпифизарным собственным мелатонином в различных периферических тканях. Содержащие его, в большинстве своем энтерохромоаффинные, клетки принадлежат к ряду апудоцитов и наиболее полно представлены в различных элементах желудочно-кишечного тракта [4].

Как и в эпифизе, внеэпифизарный мелатонин проходит аналогичные этапы синтеза при участии тех же ферментов. Знаменательно, что его общее количество в ткани этих органов в десятки раз превосходит уровень плазменного мелатонина эпифизарного происхождения. После удаления эпифиза исчезают суточные колебания содержания гормона в плазме крови, но за счет периферических клеточных элементов в дневные часы он продолжает в определенном количестве удерживаться в сосудистом русле.

Влияние мелатонина на воспалительный процесс

Существует ряд клинических и экспериментальных данных о влиянии мелатонина на различные патологические состояния, связанные с воспалением. Среди них воспалительные поражения суставов, внутренних органов (например, язвенный колит), периферических нервов. Следует сразу подчеркнуть, что такие факты не всегда однозначно указывают на клиническую эффективность препарата [3,5].

Прежде всего, по наблюдениям отдельных исследователей, повторное введение препаратов мелатонина пациентам с ревматоидным артритом может успешно дополнить базовую терапию и повысить ее эффективность. Так, при ежедневном применении (3 мг в

сутки) описано более выраженное ослабление утренней скованности, уменьшение количества опухших и болезненных суставов. Клиническое улучшение коррелировало с нормализацией ночного сна и перестройкой ритма суточной секреции кортизола. При более высокой дозе (10 мг) мелатонин наряду с некоторым ограничением симптомов ревматоидного артрита значительно оптимизировал антиоксидантный статус у пациентов. Многочисленная информация также представлена о способности мелатонина (3-6 мг) снимать головные боли различного происхождения. У людей и животных мелатонин также ограничивал ототоксическое действие аминогликозидных антибиотиков, оптимизировал лечение пациентов с ожогами, а при длительном (6-12 месяцев) применении улучшал состояние пациентов с язвенным колитом. В то же время имеются данные о способности мелатонина в некоторых случаях обострять течение ревматоидного артрита у пациентов и при его экспериментальном моделировании на животных [5].

Учитывая преобладание информации, указывающей на ограничение воспалительных проявлений мелатонина, вводимого извне, следует признать, что важно искать связь между уровнем эндогенного мелатонина и выраженностью симптомов. Однако результаты этого поиска еще не дают однозначных выводов. Согласно одной информации, радиоиммунное определение уровня гормонов плазмы у пациентов с ревматоидным артритом в ночное время указывает на снижение его значения по сравнению со здоровыми людьми, и, согласно другим данным, ревматоидный артрит и анкилозирующий спондилит, напротив, сопровождаются, напротив, увеличением секреторной активности шишковидной железы. Однако есть указание на то, что при патологии, в отличие от нормы, кривая суточной выработки мелатонина выглядит иначе, поскольку пик его содержания в плазме смещается вперед на несколько часов. Однако защитный, адаптивный характер эпифизарной гиперактивности в ответ на первичное воспалительное поражение не исключен.

Цель исследования:

Определение противовоспалительной активности мелатонина на модели «каррагенинового» отека лапы у крыс.

Материалы и методы

Изучение противовоспалительной активности мелатонина проводили на модели «каррагениновый отёк лапы» у крыс. Эксперименты выполнены на 30 белых неинбредных крысах средней массой $325,97 \pm 1,2$ г. Подопытных животных содержали в условиях вивария (с естественным режимом освещения; при температуре 22–24; относительной влажности воздуха 40–50 %) с использованием стандартной диеты (ГОСТ Р 50258-92). Исследования проводили в соответствии с правилами качественной лабораторной практики (GLP) при проведении доклинических исследований в РФ, а также правилами и Международными рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1986).

Противовоспалительную активность мелатонина оценивали в экспериментах на модели «каррагенинового» отека лапы. Острую воспалительную реакцию (отек) воспроизводили субплантарным (под подошвенный или плантарный апоневроз) введением 0,1 мл 1% раствора каррагенина (сульфатированный полисахарид из ирландского морского мха) [2]. Выраженность воспалительной реакции оценивали через 3, 12 часов после индукции воспаления по изменению объема лапы (онкометрически). Исследуемые вещества

наносили на лапы крыс в виде мази. Противовоспалительный эффект, оцениваемый по уменьшению отека, выражали в процентах по отношению к контролю.

В качестве исследуемого вещества был выбран мелатонин в составе двух препаратов: Мелатонин + L-теанин 200 мг (Производитель: Nature Made) и Мелаксен (Производитель: Юнифарм). Исследуемые вещества наносили на лапы крыс в виде мази, изготовляемой непосредственно перед экспериментом путем добавления измельченных препаратов к мазевой основе (10% раствор Натрий –КМЦ). Препаратом сравнения был выбран Диклофенак– стандартное НПВС.

Подопытные животные были разделены на 4 группы (по 6 крыс в каждой):

- 1) Крысы, получавшие Мелатонин с теанином в дозе 10 мг/мл – 0,1 мл;
- 2) Крысы, получавшие Мелаксен в дозе 10 мг/мл – 0,1 мл;
- 3) Крысы, получавшие Диклофенак в дозе 10 мг/мл – 0,1 мл;
- 4) Крысы контрольной группы

Результаты

Было выявлено, что при субплантарном введении 0,1 мл 1 % раствора каррагинина у подопытных крыс развивается выраженный отек лапы, о чем свидетельствует достоверное увеличение ее объема. Отмечено, что максимальный отёк лапки (пик воспаления) развивался через 3 часа после введения каррагинина, при этом объем лапы у подопытных животных контрольной группы увеличивался в среднем на $82,5 \pm 5,7\%$.

При нанесении НПВС Диклофенака показатель прироста объема лапы составил $28,33 \pm 5,4\%$ через 3 часа после индукции воспаления и нанесения препарата по сравнению с фоновым значением. При нанесении препаратов мелатонина это значение составило в среднем $52,08 \pm 7,7\%$. Также были найдены достоверные отличия между мелатонинсодержащими препаратами: прирост объема лапы крысы при применении Мелатонина с L-теанином составил $63,33 \pm 5,4\%$, Мелаксена – $40,83 \pm 9,9\%$.

При онкометрическом измерении объема лап крыс через 12 часов после индукции воспаления и нанесения препаратов достоверно наблюдалось уменьшение объема лап крыс по сравнению с измерениями через 3 часа после индукции воспаления: при нанесении Диклофенака на $15,33 \pm 2,4\%$; мелатонинсодержащих препаратов - на $23,33 \pm 5,6\%$ в среднем. Причем показатели мелатонинсодержащих препаратов достоверно отличались между собой, при нанесении Мелатонина с L-теанином объем лап крыс уменьшился на $26,63 \pm 5,8\%$, при нанесении Мелаксена – на $20,03 \pm 5,3\%$.

Показатели объема лапы крыс в мл. (Таблица №1):

Название препарата	Объем лапы крысы, мл.		
	Фон	Через 3 часа	Через 12 часов
Мелатонин+теанин	0,96	1,59	1,33
Мелаксен	0,92	1,33	1,13
Диклофенак	0,98	1,27	1,08
Контрольная группа	1,06	1,88	1,23

Таб.1 Объемы лап крыс

Прирост объема лапы крысы в процентном отношении (Таблица №2):

Название препарата	Прирост объема лапы крысы, %	
	Через 3 часа	Через 12 часов
Мелатонин+теанин	63,33	36,70
Мелаксен	40,83	20,80
Диклофенак	28,33	13,00
Контрольная группа	82,50	17,50

Таб.2 Прирост объема лапы в процентном отношении

Показатели объема лапы крыс в процентном отношении (Диаграмма №1):

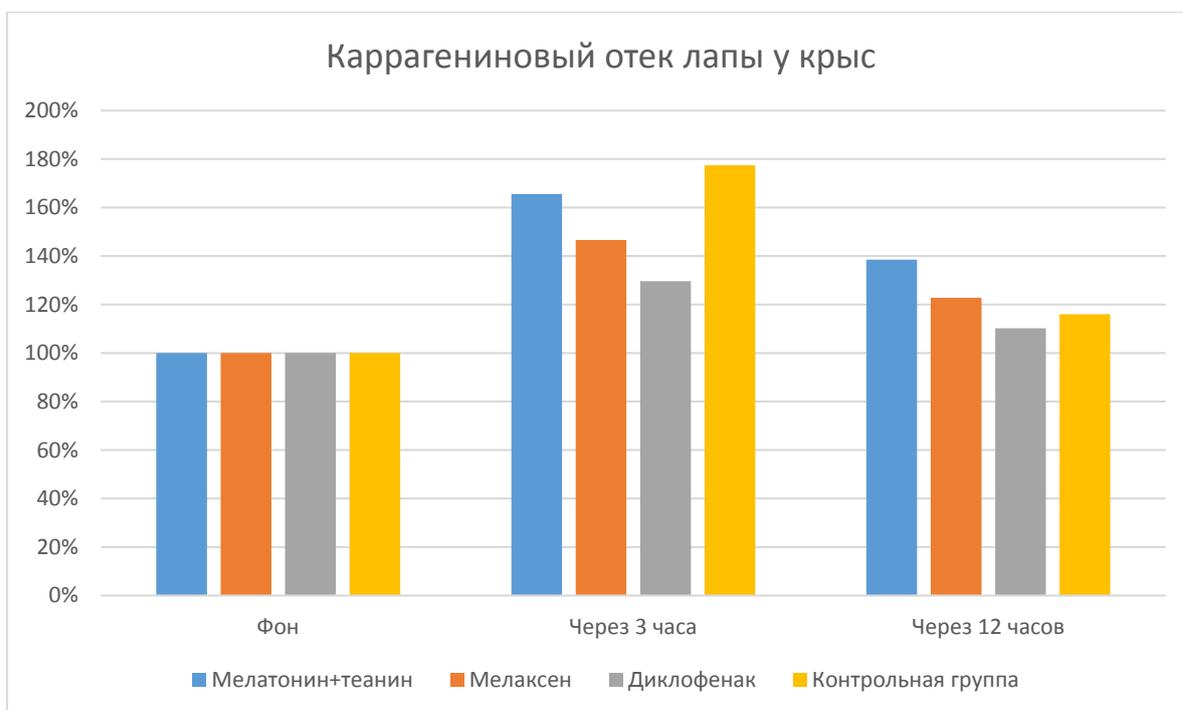


Диаграмма 1. Показатели объема лапы крыс в %

Выводы: на основании данных онкометрических измерений при индукции «каррагенинового» отека лап у крыс показано, что мелатонин обладает выраженным противовоспалительным действием.

Список источников:

1. Верин, В. К. Гормоны и их эффекты / В.К. Верин, В.В. Иванов. - М.: Фолиант, 2011. - 136 с.
2. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
3. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin / D. X. Tan// J. Pineal. Res. – 2003. – Vol. 34,ol. №1. – P.75-78.
4. Melatonin cytotoxicity in human leukemia cells: relation with its pro-oxidant effect / M. Buyukavei// Fundam. Clin. Pharmacol. – 2006. – Vol. 20, №1. – P. 73-79.
5. Zimecki, M. The lunar cycle: effects on human and animal behavior and physiology / M. Zimecki// Postepy Hig. Med. Dosw. (Online). – 2006. - № 60. – P.1-7.