

© Коллектив авторов, 2015
УДК 599.323.4:616.831.45
DOI – <http://dx.doi.org/10.14300/mnnc.2015.10064>
ISSN – 2073-8137

ВЛИЯНИЕ УДАЛЕНИЯ ЭПИФИЗА НА НЕКОТОРЫЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И АКТИВНОСТЬ ПРОТИВОРЕВМАТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ У КРЫС С АДЪЮВАНТНЫМ АРТРИТОМ

С. С. НАУМОВ, К. В. ЛОМОНОСОВА, Э. Б. АРУШАНЯН

Ставропольский государственный медицинский университет, Россия

INFLUENCE OF PINEALECTOMY ON SOME HEMATHOLOGIC INDICES AND ACTIVITY OF ANTIREUMATOID DRUGS IN RATS WITH ADUVANT ARTHRITIS

NAUMOV S. S., LOMONOSOVA K. V., ARUSHANIAN E. B.

Stavropol State Medical University, Russia

На модели экспериментального ревматоидного артрита установлено, что в крови крыс с удалённым эпифизом по сравнению с ложно оперированными животными падает плазменное содержание мелатонина, повышается уровень кортизола и нарастают показатели воспаления. Одновременно изменяется противовоспалительная активность преднизолона и диклофенака. Введение извне препарата мелатонина сопровождается ограничением гуморальных показателей воспалительного процесса.

Ключевые слова: артрит, эпифиз, мелатонин, противоревматические средства

In the experimental model of rheumatoid arthritis it was determined that in the blood of rats with remote epiphysis, compared to falsely operated animals, plasma melatonin content falls, the level of cortisol increases and indicators of inflammation increase. At the same time, inflammatory activity of prednisolone and diclofenac changes. The outside introduction of the drug of melatonin is accompanied by a limitation of humoral parameters of inflammation.

Key words: arthritis, pinealectomy, melatonin, anti-inflammatory drugs

Согласно результатам наших предыдущих исследований, повторное использование препарата основного гормона мозговой железы эпифиза мелатонина (МТ) у крыс ограничивает выраженность гематологических сдвигов, которые сопутствуют моделированию аутоиммунного поражения сустава [3]. Представлялось интересным определить, в какой мере в ограничении такого рода воспалительного процесса может участвовать естественный гормон, секретлируемый железой, и не несёт ли он ответственность за противовоспалительный эффект некоторых традиционных средств, использующихся для терапии ревматоидной патологии. В этой связи на модели адъювантного артрита у крыс на фоне хирургического удаления эпифиза и ложной операции изучен ряд показателей крови, характеризующих суставное поражение, при введении традиционных противоревматических веществ.

Объектом изучения послужили диклофенак (представитель группы нестероидных противовоспалительных средств) и преднизолон (типичный глюкокортикоидный препарат) в сравнении с эффектами экзогенного МТ.

Материал и методы. Опыты выполнены на 88 беспородных белых крысах-самцах массой 170–200 г, полученных из питомника «Рапполово» РАМН, которых содержали в условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к пище и воде. Эксперименты проводили в летне-осенний период года с соблюдением международных принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (Страсбург, 1986). Предварительно у всех животных определяли исходный уровень поведенческой активности с помощью традиционных методик («открытое поле», приподнятый крестообразный лабиринт), а также гематологические показатели воспалительного про-

цесса (см. ниже). В дальнейшем производили оперативное вмешательство, когда у равного числа крыс хирургическим путём удаляли эпифиз (основная эпифизэктомированная группа), а у оставшейся половины производили ложную операцию в виде трепанации черепа без удаления железы (контрольная группа сравнения). Спустя 5 суток у всех крыс моделировали ревматоидный артрит путём однократной инъекции под кожу правой задней конечности (субплантарно) 0,1 мл адьюванта Фрейнда (АФ) (Pierce Biotechnology, США), который содержит убитые микобактерии, суспендированные в масле [5]. На 14-й день после этого основную и контрольную экспериментальные серии разбивали на 4 равные подгруппы (по 11 особей). Одна использовалась в качестве контроля, в остальных крысы внутрибрюшинно в течение двух недель получали растворы соответственно МТ (мелаксен фирмы Unipharm, США, 5 мг/кг), диклофенака (Nemofarm, Сербия, 8 мг/кг) или преднизолона (Гидеон Рихтер, Венгрия, 1 мг/кг). Все инъекции производили в вечернее время (с 19.00 до 20.00 часов). До начала исследования и на 14-е и 28-е сутки из хвостовой вены крыс в вакутейнеры фирмы DNK (Тайвань) забирали кровь (не менее 0,5 мл) в те же вечерние часы.

В образцах крови определяли следующие показатели: С-реактивный белок (СРБ) (методом иммунотурбодиметрии с реагентом CRPL3 на биохимическом модуле анализатора Cobas 6000 [9]); число лейкоцитов (автоматически на гематологическом анализаторе Sysmex XT-2000); ревматоидный фактор (РФ) класса М (методом двухстадийного иммуноферментного анализа на спектрофотометре 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 (Clinical guide, 2006). Плазменное содержание кортизола и МТ оценивали посредством иммуноферментного анализа.

Оперативные вмешательства производили под наркозом (золетил 5 мг/кг внутримышечно). С целью удаления эпифиза использовали разработанный в нашей лаборатории метод щадящей эпифизэктомии [4], позволявший после вскрытия черепной коробки избежать повреждения саггитального синуса и чрезмерной кровопотери. В случае ложной операции после выполнения тех же этапов операции дело ограничивалось трепанацией черепа без эпифизэктомии. По окончании экспериментов крыс умерщвляли с использованием наркоза и экстирпацию железы верифицировали макроскопически.

Полученные результаты обработаны статистически с использованием парного критерия

Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа посредством пакета компьютерных программ BIostat.

Результаты и обсуждение. В соответствии с ранее сделанными наблюдениями [3], экспериментальному ревматоидному артриту у крыс сопровождали характерные поведенческие и гематологические сдвиги. Они свидетельствовали о наличии системной воспалительной патологии, которой сопутствовали и определённые эндокринные нарушения. На 5-е сутки после введения АФ в области поражённого сустава возникали отёк и гиперемия. Внешне животные выглядели вялыми и малоподвижными, падало также потребление пищи. В тестах «открытое поле» и «крестообразный лабиринт» отчётливо уменьшалась горизонтальная и вертикальная двигательная активность.

Судя по результатам наблюдений за животными контрольной (ложно оперированной) группы, в их крови отчётливо прогрессировали показатели генерализованной воспалительной реакции, совпадавшие с усилением внешних признаков суставной патологии. На усугубление воспалительного процесса среди прочего указывало повышение плазменного уровня С-реактивного белка и лейкоцитов. О возрастании иммунологической реактивности свидетельствовал рост числа ЦИК и величины ревматоидного фактора (табл. 1). Этому сопутствовали изменения эндокринного статуса в виде повышения содержания в крови кортизола и, напротив, снижение уровня МТ (табл. 2), что совпадает с представлениями о реципрокных отношениях в деятельности эпифиза и коры надпочечников в естественных условиях [1].

Таблица 1

Гематологические показатели у ложнооперированных и эпифизэктомированных крыс с ревматоидным артритом

Вмешательство	Показатель	Исходные данные	Через 14 дней после введения АФ
Ложная операция	СРБ	0,29±0,04	32,58±2,2 ⁺
	Лейкоциты, *10 ⁹ /л	4,52±0,6	31,3±1,8 ⁺
	ЦИК, ЕД	23,1±4,1	87,4±9,3 ⁺
Эпифизэктомия	РФ, МЕ/мл	16,7±3,1	43,6±1,7 ⁺
	СРБ	0,37±0,09	63,21±4,6 ^{*+}
	Лейкоциты, *10 ⁹ /л	4,61±0,2	45,2±2,4 ⁺
	ЦИК, ЕД	19,9±2,3	113,2±17,4 ^{*+}
	РФ, МЕ/мл	15,4±2,3	78,9±3,1 ^{*+}

Примечания:

* – достоверность разницы по сравнению с ложной операцией;

+ – достоверность разницы по сравнению с предыдущим измерением.

Таблица 2

Влияние эпифизэктомии на гормональный статус и действие противовоспалительных веществ

Операция	Показатель	Препараты	Исходные данные	Через 14 дней после введения АФ	Через 14 суток после введения препаратов
Ложная операция	Кортизол, нмоль/л	Диклофенак	77,37±2,79	165,46±7,48 ⁺	152,3±8,2
		Преднизолон	79,02±3,86	167,22±13,5 ⁺	45,0±5,8 ⁺
		Мелатонин	81,42±3,17	154,81±9,87 ⁺	99,64±18,0 ⁺
	Мелатонин, пг/мл	Диклофенак	90,1±6,4	79,3±5,5	76,1±5,1
		Преднизолон	91,0±6,0	70,0±6,8 ⁺	77,1±7,9
		Мелатонин	101,5±9,2	69,5±3,1 ⁺	112,04±8,2 ⁺
Эпифизэктомия	Кортизол, нмоль/л	Диклофенак	78,1±2,79	301,44±25,99 ⁺	242,0±17,4 ⁺ *
		Преднизолон	75,66±3,26	335,41±20,55 ⁺	56,2±5,3 ⁺
		Мелатонин	79,23±2,51	341,69±12,8 ⁺	112,68±9,1 ⁺ *
	Мелатонин, пг/мл	Диклофенак	96,9±3,8	6,6±1,4 ⁺	21,6±2,5 ⁺
		Преднизолон	98,9±3,7	5,4±1,4 ⁺	28,1±8,3 ⁺ *
		Мелатонин	114,3±8,3	6,2±2,1 ⁺	64,3±1,9 ⁺ *

См. примечания к таблице 1.

Удаление эпифиза заметно потенцировало выраженность поведенческих и гематологических сдвигов, которые сопутствовали экспериментальному артриту. На таком фоне существенно возрастали абсолютные величины СРБ, лейкоцитоза, ЦИК и РФ. В большинстве случаев этот прирост имел статистически значимый вид (табл.1). Сходная тенденция установлена и в отношении гормональных показателей. Уровень

плазменного кортизола, например, у эпифизэктомированных крыс оказался почти в 4 раза выше, чем после ложной операции (847±198 против 185±5 нмоль/л, при p<0,05) (табл. 3). Обратно направленные сдвиги происходили при оценке содержания мелатонина в крови, концентрация которого после удаления железы снижалась более заметно (23,3±1 против 60±7,5 пг/мл при p<0,05).

Таблица 3

Гематологические показатели при введении лекарственных препаратов у животных с ложной операцией

Препарат	Показатель	Исходные данные	Через 14 дней после введения АФ	Через 14 суток после введения препаратов
Диклофенак	СРБ	0,33±0,07	34,96±3,2 ⁺	18,2±2,09 ⁺
	Лейкоциты, 10 ⁹ /л	4,89±0,2	29,7±1,6 ⁺	16,9±0,7
	ЦИК, ЕД	18,7±4,5	98,4±13,2 ⁺	84,7±5,1
	РФ, МЕ/мл	14,9±2,3	57,2±2,8 ⁺	58,3±5,2
Преднизолон	СРБ	0,53±0,1	34,3±1,9 ⁺	11,9±1,6 ⁺
	Лейкоциты, 10 ⁹ /л	4,81±0,6	34,6±1,9 ⁺	10,2±2,4 ⁺
	ЦИК, ЕД	29,8±4,7	88,5±21,4 ⁺	29,7±1,8 ⁺
	РФ, МЕ/мл	14,8±1,7	51,5±4,1 ⁺	30,6±2,8 ⁺
Мелатонин	СРБ	0,42±0,06	31,8±4,1 ⁺	7,9±0,4 ⁺
	Лейкоциты, 10 ⁹ /л	4,32±0,3	30,7±1,5 ⁺	9,0±2,4 ⁺
	ЦИК, ЕД	20,1±2,7	89,6±13,2 ⁺	26,7±4,1 ⁺
	РФ, МЕ/мл	16,4±3,6	62,4±3,8 ⁺	32,5±4,8 ⁺

См. примечания к таблице 1.

Вместе с тем на фоне эпифизэктомии в сравнении с ложной операцией наблюдалась отчётливая тенденция к менее значительному ограничению противовоспалительной активности изученных средств (табл. 3 и 4). Данное обстоятельство оказалось справедливым для всех препаратов (диклофенака, преднизолона, мелатонина). Так, если у

животных с удалённым эпифизом глюкокортикоид преднизолон снижал, например, активность ЦИК до 43,2±3,9 ЕД, то в контрольной группе этот сдвиг был заметнее (29,7±1,8 ЕД). Другой пример: после введения диклофенака на фоне эпифизэктомии активность РФ составляла 85,3±4,8 МЕ, а в случае ложной операции 58,3±5,2 МЕ и т. д.

Таблица 4

Гематологические показатели у крыс с удалённым эпифизом при введении лекарственных препаратов

Препарат	Показатель	Исходные данные	Через 14 дней после введения АФ	Через 14 суток после введения препаратов
Диклофенак	СРБ	0,42±0,07	65,86±6,2 ^{*+}	40,9±4,1 ^{*+}
	Лейкоциты, 10 ⁹ /л	4,31±0,3	48,5±3,1 ^{*+}	27,4±1,2 ⁺
	ЦИК, ЕД	32,5±7,1	123,5±19,6 ^{*+}	99,8±7,4 ^{*+}
	РФ, МЕ/мл	14,3±2,4	89,4±4,6 ⁺	85,3±4,8 ⁺
Преднизолон	СРБ	0,44±0,08	62,15±6,9 ^{*+}	15,3±1,6 ⁺
	Лейкоциты, 10 ⁹ /л	4,78±0,2	40,2±2,8 ⁺	19,7±1,4 ⁺
	ЦИК, ЕД	36,4±2,1	116,9±12,7 ^{*+}	43,2±3,9 ^{*+}
	РФ, МЕ/мл	19,8±3,2	85,4±5,1 ^{*+}	39,7±4,7 ⁺
Мелатонин	СРБ	0,36±0,04	62,1±4,2 ^{*+}	9,5±1,2 ⁺
	Лейкоциты, 10 ⁹ /л	4,92±0,4	49,1±2,4 ⁺	17,4±2,1 ^{*+}
	ЦИК, ЕД	25,4±6,1	119,5±23,1 ^{*+}	48,6±4,3 ^{*+}
	РФ, МЕ/мл	18,9±2,8	80,4±2,6 ^{*+}	41,4±4,2 ⁺

См. примечания к таблице 1.

Таким образом, согласно представленным сведениям, удаление эпифиза у крыс по сравнению с ложно оперированными животными способствует провоспалительному эффекту, усиливая гематологические сдвиги, вызванные АФ. Одновременно меняются действие противоревматических веществ и эндокринный статус животных с ростом уровня плазменного кортизола и снижением содержания в крови МТ.

Хотя эпифиз служит источником самых разных биологически активных соединений, имеется достаточно аргументов в пользу связи обнаруженных сдвигов с дефицитом основного гормона железы МТ. На это, прежде всего, указывают данные о снижении плазменной концентрации МТ после эпифизэктомии и способности экзогенного МТ нивелировать возникающий провоспалительный эффект. Действительно, в изученной дозе (5 мг/кг) он по всем критериям успешно ограничивал проявления эпифизарной недостаточности. Это позволяет в очередной раз ставить вопрос о существовании у гормонального препарата противовоспалительных свойств.

Последний вывод согласуется с целым рядом ранее представленных литературных фактов в пользу того, что МТ может не просто лимитировать воспалительный процесс, но и вмешиваться в течение аутоиммунных реакций, частным примером которых служит описанный в настоящей работе адьювантный артрит. В самом деле, по наблюдениям Easte с соавторами [7], у крыс с такой экспериментальной моделью ревматической патологии уже при кратковременном введении (3 дня), правда, некорректно высоких, на наш взгляд, доз МТ (50 и 60 мг/кг) существенно ограни-

чивался отёк конечности с одновременным повышением болевого порога. В опытах на другой модели воспалительного поражения суставов (субплантарные инъекции в заднюю лапу крысы каррагенина) также обнаружено уменьшение местного отёка и ослабление болезненности под влиянием достаточно низких (0,5 и 1 мг/кг) доз МТ при отчётливом синергизме гормона с индометацином [8]. Кроме того, получены экспериментальные доказательства возможной эффективности МТ и при других видах аутоиммунной патологии типа красной волчанки и рассеянного склероза [10]. Есть основания полагать, что подобное протективное действие МТ определяется сочетанием в его фармакодинамике собственно противовоспалительных и иммуномодуляторных свойств [2, 11].

Заключение. Как показывает проведённое в настоящей работе сравнительное изучение противовоспалительных возможностей МТ и средств традиционной противоревматической терапии (диклофенака и преднизолона), в использованном диапазоне доз они демонстрируют специфическую активность, хотя по силе её выраженности и уступают МТ. С другой стороны, на фоне эпифизэктомии их действие выглядит слабее, чем у ложно оперированных крыс. Это позволяет предположить, что эффект подобных препаратов отчасти может реализоваться и через мобилизацию противовоспалительных свойств биологически активных соединений самого эпифиза, и в первую очередь МТ. Полученные факты дают право рекомендовать более широкое клиническое изучение этого естественного и мало токсичного агента в качестве потенциального лечебного средства для борьбы с ревматическими заболеваниями.

Литература

1. Арушанян, Э. Б. Место эпифизарно-адренкортикальных отношений в поправочной регуляции поведения / Э. Б. Арушанян, Л. Г. Арушанян, К. С. Эльбекьян // Успехи физиол. наук. – 1993. – Т. 24, № 4. – С. 12–28.
2. Арушанян, Э. Б. Противовоспалительные возможности мелатонина / Э. Б. Арушанян, С. С. Наумов // Клини. мед. – 2013. – № 7. – С. 18–22.
3. Арушанян, Э. Б. 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. Ломоносова // Экспер. и клин. фармакол. – 2014. – Т. 77, № 3. – С. 13–15.
4. Ованесов, К. Б. Новый подход к удалению эпифиза у крыс / К. Б. Ованесов // Актуальные проблемы хирургии. – Ставрополь, 1987. – С. 173–175.
5. Хабриев, Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р. У. Хабриев. – М.: Медицина, 2005.

6. Easte, G. Melatonin administration reduces inflammatory pain in rats / G. Easte, I. C. Macedo, J. Ripoli Rozisky // J. Pain Res. – 2012. – Vol. 5. – P. 359–362.
7. El-Shenawy, S. N. Studies on the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of melatonin in the rat / S. N. El-Shenawy, O. M. Abdel-Salam, A. R. Bajoumy [et al.] // Pharmacol. Res. – 2002. – Vol. 46. – P. 235–243.
8. Clinical Guide to Laboratory Tests / ed. A. N. Wu. – Sonders Comp, 2006.
9. Greiling, H. *Lerbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie* / H. Greiling, A. M. Greassner. – Stuttgart – New York, 1995.
10. Lin, G. J. Modulation by melatonin of the pathogenesis of inflammatory autoimmune diseases / G. J. Lin, S. H. Huang, S. J. Chen [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – Vol. 14. – P. 11742–11766.
11. Reiter, R. J. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation / R. J. Reiter, J. R. Colvo, M. Karbownik [et al.] // Ann. N. A. Acad. Sci. – 2000. – Vol. 917. – P. 376–386.

References

1. Arushanian E. B., Arushanian L. G., Elbekian K. S. *Uspechi Fisiol. Nauk – Advan. Physiol. Sci.* 1993;24 (4):12-28.
2. Arushanian E. B., Naumov S. S. *Klin. Med. – Clinical Medicine.* 2013;7:18-22.
3. Arushanian E. B., Naumov S. S., Ivanova V. N., Lomonosova K. V. *Eksp. i klin. Farmakol. – Exper. and clin. Pharmacol.* 2014;77 (3):13-15.
4. Ovanesov K. B. *Aktualnye problemy khirurgii. – Actual Problems of Surgery.* Stavropol; 1987:173-175.
5. Habriev R. U. *Rukovodstvo po eksperimentalnomu isucheniyu novih farmakologicheskikh veshhestv.* Moscow; 2005.
6. Easte G., de Macedo I. C., Ripoli Rozisky J. *J. Pain Res.* 2012;5:359-362.
7. El-Shenawy S. N., Abdel-Salam O. M., Bajuomy A. R. *Pharmacol. Res.* 2002;46:235-243.
8. *Clinical Guide to Laboratory Tests.* Ed. A. N. Wu, Sonders Comp; 2006.
9. Greiling H., Gressner A. M. *Lerbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie,* Stuttgart-New York; 1995.
10. Lin G. J., Huang S. H., Chen S. J. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14:11742-11766.
11. Reiter R. J., Colvo J. R., Karbownik M. *Ann. N.A. Acad. Sci.* 2000;917:376-386.

Сведения об авторах:

Наумов Станислав Сергеевич, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры фармакологии Ставропольского государственного медицинского университета; тел.: +79064898117; e-mail: n_stanislav@mail.ru

Ломоносова Ксения Владимировна, студентка 6 курса лечебного факультета Ставропольского государственного медицинского университета; тел.: (8652)354881; e-mail: pharmacology@stgma.ru

Арушанян Эдуард Бениаминович, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий кафедрой фармакологии Ставропольского государственного медицинского университета; тел.: (8652)354881; e-mail: pharmacology@stgma.ru

© Л. М. Кузякова, М. А. Черницова, 2015

УДК 338.12.017:615.12

DOI – <http://dx.doi.org/10.14300/mnnc.2015.10065>

ISSN – 2073-8137

МОДЕЛЬ РАЗРАБОТКИ И ПРОИЗВОДСТВА ИННОВАЦИОННОЙ ПРОДУКЦИИ: ОПЫТ ПРАКТИЧЕСКОГО ВНЕДРЕНИЯ

Л. М. КУЗЯКОВА, М. А. ЧЕРНИЦОВА

Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

MODEL OF DEVELOPMENT AND MANUFACTURING OF INNOVATIVE PRODUCTS: EXPERIENCE OF REALIZATION

KUZYAKOVA L. M., CHERNITSOVA M. A.

North Caucasus Federal University, Stavropol, Russia

На основе анализа научной литературы и собственного опыта работы сконструирована поэтапная модель разработки и реализации инновационных проектов производства конкурентоспособной парафармацевтической продукции. Реализация данной модели позволяет: изучить информацию о состоянии такого сегмента фармацевтического рынка, как лечебная косметика, выявить перспективные ассортиментные группы товаров, исследовать потребительские предпочтения и на основе результатов анализа выбрать направление инновационного проектирования.

Реализация комплекса последовательных этапов инновационных проектов для производства новой продукции позволит, с одной стороны, значительно расширить ассортимент отечественной эффективной продукции для удовлетворения возрастающих потребностей населения; с другой – укрепить конкурентные преимущества малых фармацевтических предприятий на современном рынке.

Ключевые слова: лечебная косметика, малое инновационное предприятие, модель инновационного развития

Based on the analysis of the scientific literature and our own experience the stepwise model of the development and realization of innovative projects of small parapharmaceutical companies was worked out. The above model includes investigation of the pharmaceutical market, identification of the potential product lines, exploring of the consumer preferences and choice of the direction for innovative search. Later carried out the search and the generation of ideas for new product development and business plan for its production. Further research is needed to select the formulation of cosmetics. In the production