

О.О. Шандра

Вплив дельтарану та мелатоніну на стан імунної системи щурів за умов експериментального контактного дерматиту

Досліджували активність гуморального і клітинного ланок імунітету, а також показників функціональної стабільності лейкоцитів у щурів з експериментальним контактним дерматитом (ЕКД) в умовах комплексної фармакологічної корекції введенням дельтарану і мелатоніну. Дослідження проводили в умовах хронічного експерименту на моделі хроміндукованого ЕКД. Для комплексної фармакологічної корекції показників гуморального і клітинного ланок імунітету, а також стабільності лейкоцитів використали роздільні та сумісні введення дельтарану й мелатоніну. Отримані результати показали, що за умов хроміндукованого ЕКД у щурів відзначаються виражені порушення гуморального і клітинного ланок імунітету, а також змінюється функціональна стабільність нейтрофілів і лімфоцитів. Виявлені порушення функціональної активності імунної системи корегували в умовах сумісного застосування дельтарану й мелатоніну. При цьому активність лікувального комплексу мала потенціуючий характер.

Ключові слова: експериментальний контактний дерматит, імунологічна реактивність, показник пошкодження нейтрофілів, показник пошкодження лімфоцитів, дельтаран, мелатонін, фармакологічна корекція.

ВСТУП

Встановлено залежність стану імунологічної реактивності від тривалості та характеру сну: активність натуральних кілерів зменшується за умов тривалого безсоння, система прозапальних цитокінів залежно від дози та фази циркадіанного ритму викликає як сомногенний, так і протилежний за характером впливи в експериментальних умовах [7].

Мелатонін, який здатен індукувати сон [10], послаблює спровоковані стресом порушення вмісту інтерлейкінів (ІЛ) – ІЛ-1 α , ІЛ-1 β , ІЛ-2, інтерферону γ , грануломоноцитарного факторів у щурів [2]. Застосування δ -соніндукуючого пептиду (ДСІП) попереджає імунологічні порушення, які викликані стресорним впливом, супроводжується зменшенням числа еозинофілів крові, а також збільшенням кількості лімфоїдних клітин у структурах слизової оболонки дванадцятипалої кишки щурів [8].

© О.О. Шандра

Зважаючи на те, що в патогенезі контактного дерматиту значне місце посідають механізми порушень стану імунологічної реактивності [4], а також визначено типові порушення циклу сон-неспаня за експериментальних умов [3], доцільним було вивчення проявів експериментального контактного дерматиту (ЕКД) на тлі застосування препаратів, які нормалізують циркадіанні ритми.

Метою нашої роботи було вивчення активності гуморальної та клітинної ланок імунологічної реактивності щурів із ЕКД за умов комплексної фармакологічної корекції введенням дельтарану та мелатоніну.

МЕТОДИКА

Робота виконана за умов хронічного експерименту на 72 щурах самцях лінії Вістар віком 3–6 міс і масою від 250 до 320 г. Експериментальних тварин утримували за стандартних

умов віварію та вільним доступом до їжі та води. Досліди проводили з дотриманням основних нормативних та етичних вимог до проведення лабораторних та інших дослідів. Результати досліджень було схвалено етичним комітетом ОНМедУ.

Для відтворення ЕКД щурів сенсibilізували 0,25%-м розчином біхромату калію протягом 20 діб [5]. Вогнище сенсibilізації відтворювали на бічній ділянці спини щура (3x3 см), з якого завчасно вистригали шерстяний покрив [3, 5]. Розчин біхромату калію втирали в ділянку шкіри спини раз на добу протягом 4,5–5,0 хв, для чого використовували марлеві серветки, змочені в розчині біхромату. Тестову дозу алергену наносили на 21-ту добу від початку сенсibilізації на аналогічну ділянку шкіри контрлатерального боку. Виникнення проявів ЕКД контролювали за ознаками запалення, виразність яких оцінювали за шестибальною шкалою [3].

Виділяли наступні групи тварин: I група – контрольні щури (n=9), II – щури із ЕКД без лікування (n=13), III – інтактні щури (n=9), яким вводили дельтаран (0,1 мг/кг; НДІВС з виробництва бакпрепаратів, РФ), IV – щури із ЕКД (n=15), яким з лікувальною метою вводили дельтаран (0,1 мг/кг), V – інтактні щури (n=9), яким вводили мелатонін (10 мкг/кг), VI – щури із ЕКД, яким з лікувальною метою вводили мелатонін дозою 10 мкг/кг (n=15), VII – щури із ЕКД (n=17), яким вводили дельтаран і мелатонін дозами 0,1 та 10 мг/кг відповідно. Препарати вводили внутрішньо-очеревинно. Більша кількість щурів у IV, VI та VII групах пояснюється виконанням спостережень в двох експериментальних серіях.

Через 24 г з моменту аплікації допустимої дози алергену досліджували активність гуморальної та клітинної ланок імунітету щурів, а також показники пошкодження нейтрофілів і лімфоцитів (ППН і ППЛ відповідно). Як величини, які характеризували функціональний стан гуморального імунітету за умов ЕКД, обирали кількість В-лімфоцитів, а також концентрацію імуноглобулінів А, М та G, що робили згідно з загальноприйнятим методом [6]. Число у крові

Т-лімфоцитів, а також їх субпопуляцій, які виконували функції Т-хелперів та Т-супресорів з визначенням чутливості до теофіліну (клітини, які мають супресорно-кілерні властивості, та теофілінрезистентні клітини, яким притаманні хелперно-індукторні властивості) приймали за характеристику функціональної активності клітинного імунітету та вивчали за методом Чернушенка та Когосова [6]. Визначали ППН і ППЛ, які є інформативними щодо функціональної стабільності лейкоцитів у периферичній крові за умов алергічних захворювань [9].

Статистичну обробку результатів дослідження проводили із застосуванням методу ANOVA та Newman-Keuls тесту при рівні вірогідності $P < 0,05$ [3].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Розвиток ЕКД характеризувався виникненням у зоні нанесення розчину біхромату калію помірної гіперемії (1–2 бали), що спостерігалось на 5-ту добу експерименту. Висока виразність місцевих запальних порушень визначалася наприкінці другого тижня аплікацій алергену, коли у тварин з'являлися ерозивно-виразкові зміни, які протягом наступних п'яти аплікацій розвивались у виразні інфільтративно-виразкові ураження (4–5 балів). Нанесення допустимої дози розчину алергену на шкіру з протилежного боку (до цього не проводили аплікацій), викликало виразні запальні зміни з формуванням ерозивно-виразкових елементів (3–4 бали).

На тлі проявів ЕКД суттєво зростала кількість В-лімфоцитів, яка була на 40,1 % вищою за відповідні значення в контрольній групі тварин ($P < 0,01$; табл. 1). Введення інтактним щурам дельтарану та мелатоніну не впливало на число В-лімфоцитів у крові ($P > 0,05$). Після роздільного їх введення щурам із ЕКД значення досліджуваних показників становили $19,6 \pm 1,7$ та $20,4 \pm 1,8$ % відповідно, що було на 28,9 та на 34,2 % більше, ніж у контрольних спостереженнях ($P < 0,05$) і не відрізнялося від значень у щурів із ЕКД без лікування

Таблиця 1. Вплив комплексної фармакологічної корекції на активність гуморального імунітету в щурів із контактним дерматитом (M±m)

| Група тварин | В-лімфоцити, % | Імуноглобуліни (г/л) | | |
|---|----------------|----------------------|---------------|----------------|
| | | A | M | G |
| Контроль (n=9) | 15,2±1,3 | 1,1±0,1 | 1,3 ±0,2 | 5,4 ±0,4 |
| Експериментальний контактний дерматит (ЕКД), n=13 | 21,3±2,2** | 2,4±0,3*** | 2,7 ±0,3** | 8,1 ±0,6** |
| Введення дельтарану (n= 9) | 14,6±1,2 | 1,0±0,1 | 1,4 ±0,2 | 5,1 ±0,3 |
| ЕКД і введення дельтарану (n=15) | 19,6±1,7* | 1,7±0,2*.# | 2,0 ±0,2*.# | 7,6 ±0,6* |
| Введення мелатоніну (n= 9) | 15,4±1,1 | 1,1±0,1 | 1,1 ±0,1 | 5,2 ±0,3 |
| ЕКД і введення мелатоніну (n=15) | 20,4±1,6* | 1,9±0,3** | 1,9 ±0,2# | 7,7 ±0,6* |
| ЕКД, введення дельтарану і мелатоніну (n=17) | 17,6±1,1#,** | 1,3±0,1#,** | 1,4 ±0,1##,** | 6,6 ±0,3*.#,** |

Тут і в табл. 2 *P<0,05, **P<0,01 – вірогідні розбіжності показників порівняно з відповідними показниками в контрольній групі спостережень; #P<0,05, ##P<0,01 – вірогідні розбіжності показників порівняно з відповідними показниками в групі щурів із ЕКД; ***P<0,05 – вірогідні розбіжності досліджуваних показників порівняно з такими в групах щурів із ЕКД і роздільним введенням дельтарану та мелатоніну, відповідно.

(P>0,05). Внаслідок сумісного введення дельтарану та мелатоніну щурам із ЕКД кількість В-лімфоцитів виявилася меншою на 17,0 % (P<0,05) порівняно з показниками в щурів із ЕКД без лікування та зі значеннями у групах щурів із ЕКД, яким роздільно вводили дельтаран (на 10,2 %, P<0,05) – та мелатонін (на 13,7 %, P<0,05, див. табл. 1).

Вміст імуноглобулінів у щурів із ЕКД був в 1,5 (IgG; P<0,01), 2,1 (IgM; P<0,01) та 2,2 рази (IgA; P<0,001) більшим порівняно зі значеннями у крові контрольних щурів. Внаслідок роздільного введення дельтарану та мелатоніну вміст IgA і IgM суттєво зменшувався і був на 29,2 та на 26,0 % (у разі введення дельтарану) та на 20,8 і на 29,6 % (у разі введення мелатоніну) меншим порівняно з відповідними показниками у щурів із ЕКД без лікування (P<0,05). Проте роздільне введення вказаних лікарських сполук не змінювало вміст IgG, який зменшувався при застосуванні дельтарану на 6,2 %; а при застосуванні мелатоніну – на 5,0 % (P>0,05). Сумісне їх введення викликало зменшення вмісту IgA (на 45,8 %, P<0,05), та IgM (на 48,1 %, P<0,01), а також IgG (на 18,5 %, P<0,05)

порівняно зі значеннями в щурів із ЕКД без лікування. При цьому вміст імуноглобулінів був достовірно меншим порівняно зі значеннями у щурів з ЕКД за умов роздільного застосування дельтарану та мелатоніну (P<0,05, табл. 1).

У щурів із ЕКД число Т-лімфоцитів було на 31,2 % зниженим порівняно з контролем (P<0,01; табл. 2). При застосуванні як одного дельтарану, так і мелатоніну цей показник залишався більш низьким порівняно з контрольними значеннями – на 23,7 та на 26,7 % відповідно (P<0,05).

Сумісне введення лікарських сполук підвищувало на 36,6 % число Т-лімфоцитів порівняно зі значеннями у щурів із ЕКД без лікування (P<0,05). При цьому також спостерігалися відмінності цього показника порівняно зі значеннями у групах з ЕКД, в яких застосовували окремо дельтаран (на 18,8 %) та мелатонін (на 22,0 %; P<0,05).

Перебіг ЕКД характеризувався також зменшенням числа (на 33,3 %) теофілінрезистентних Т-лімфоцитів (P<0,05) та збільшенням кількості (на 95,7 %) теофілінчутливих Т-лімфоцитів (P<0,01). Число теофілінрезист-

Таблиця 2. Вплив комплексної фармакологічної корекції на активність клітинного імунітету в щурів із контактним дерматитом (M±m)

| Групи тварин | Показники, які характеризують стан клітинного імунітету | | |
|---|---|--|--|
| | Т-лімфоцити, % | Теофілінрезистентні субпопуляції Т-лімфоцитів, % | Теофілінчутливі субпопуляції Т-лімфоцитів, % |
| Контроль (n=9) | 40,1±3,2 | 23,4±1,8 | 14,1±1,4 |
| Експериментальний контактний дерматит (ЕКД; n=13) | 27,6±2,4** | 15,6±1,4* | 27,6±2,2** |
| Введення дельтарану (n= 9) | 38,6±3,1 | 18,2±1,6 | 15,3±1,3 |
| ЕКД і введення дельтарану (n=15) | 30,6±2,3* | 18,9±1,6* [#] | 22,7±2,3** |
| Введення мелатоніну (n= 9) | 36,9±3,1 | 18,6±1,5 | 12,7±1,2 |
| ЕКД і введення мелатоніну (n=15) | 29,4±2,2* | 18,6±1,6* [#] | 23,3±2,1** |
| ЕКД, введення дельтарану і мелатоніну (n=17) | 37,7±2,7 ^{##,***} | 22,8±1,6 ^{#,***} | 18,9±1,6 ^{##,***} |

тентних Т-лімфоцитів зростало під впливом роздільного введення дельтарану (на 16,7 %), мелатоніну (в 19,2 %) та їхнього сумісного застосування (на 46,2 %) порівняно з відповідними значеннями в групі щурів з ЕКД без лікування (група II; $P < 0,05$). Досліджуваний показник при сумісному використанні препаратів був вищим від такого при окремому застосуванні дельтарану та мелатоніну на 20,6 % та на 22,6 % відповідно ($P < 0,05$).

За умов окремого застосування дельтарану та мелатоніну число теофілінчутливих Т-лімфоцитів перевищувало відповідне значення в групі контролю на 61,0 та на 65,2 % відповідно ($P < 0,01$). При сумісному використанні препаратів перевищення досліджуваного показника становило 34,0 % ($P > 0,05$) і одночасно він був меншим порівняно з такими в групах з використанням одного дельтарану та мелатоніну на 16,8 та на 18,9 % відповідно ($P < 0,05$, табл. 2).

У дослідних щурів ППН та ППЛ в 1,6 та в 2,3 раза перевищували відповідні значення в контрольних спостереженнях ($P < 0,001$; рисунок). Досліджувані показники набували значущих розбіжностей порівняно з такими в групі щурів із ЕКД без лікування лише під впливом сумісного введення дельтарану та мелатоніну. За цих

умов спостерігалось перевищення відповідних значень у контролі на 11 та на 37 % відповідно ($P > 0,05$) при одночасному зменшенні порівняно з ЕКД без лікування на 31 та на 40 % відповідно ($P < 0,05$). При цьому ППЛ залишався більшими за відповідні контрольні показники ($P < 0,05$; див. рисунок). ППН і ППЛ були також значно меншими порівняно з такими в групі із застосуванням самого дельтарану (ППН – на 24 % та ППЛ – на 28 %), а також мелатоніну (ППН – на 35 % та ППЛ – на 32 %; $P < 0,05$).

Клінічні прояви ЕКД за умов сумісного застосування дельтарану та мелатоніну не перевищували 2 бали, водночас при самостійному використанні препаратів спостерігались ерозивні елементи на 20-ту добу спостереження (3 бали).

Таким чином, отримані результати засвідчили, що за умов відтворення ЕКД, викликаного нашкірними аплікаціями розчину біхромату калію, у щурів відбуваються виражені зміни імунологічної реактивності з боку гуморального та клітинного захисту, а також порушується функціональна стабільність лейкоцитів. Показано суттєве зростання кількості В-лімфоцитів, а також імуноглобулінів груп А, М та G. Це вказує на недосконалість гуморальної ланки імунного захисту, разом зі зменшенням кількості Т-лім-

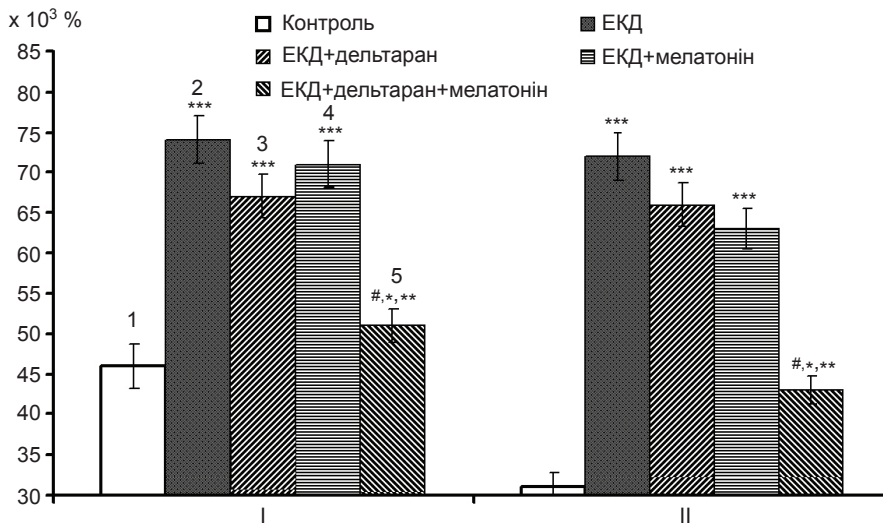
фоцитів і Т-хелперів та зростанням кількості Т-супресорів, що висвітлює недостатню функціональну активність клітинного імунитету. Слід підкреслити, що подібний характер імунологічних зрушень є характерним для ЕКД, викликаного дією сполук хрому [4]. Крім того, встановлено, що функціональна стабільність нейтрофільних лейкоцитів, а також лімфоцитів значно порушена за умов сенсibiliзації до сполук хрому, що також додатково вказує на алергічний компонент відтвореного патологічного стану.

Застосування дельтарану є виправданим через здатність викликати імунокоригувальні впливи, в тому числі за умов формування atopічних алергічних реакцій [1]. Автори зазначають, що ДСПП відновлює абсолютну кількість лейкоцитів, лімфоцитів, а також субпопуляцій $CD3^+$, $CD8^+$, $CD16^+$ у дітей, які страждають на atopічну бронхіальну астму. Проте в нашому дослідженні роздільне використання дельтарану не супроводжувалося значними позитивними зрушеннями досліджуваних показників імунологічної

реактивності. Разом з тим при його сумісному використанні з мелатоніном спостерігалася виразна коригувальна дія. Подібне потенціювання може пояснюватися комплексним характером впливу мелатоніну [10], в тому числі й при atopічних алергічних станах [11] та його здатністю до корекції хронобіологічних процесів в організмі [10], які мають важливе значення для реалізації ефектів ДСПП [1, 8].

Таким чином, експериментальний контактний дерматит призводить до порушень функціональної активності гуморальної та клітинної ланок імунологічного захисту щурів, а також функціональної стабільності лейкоцитів. Зазначені зміни успішно коригуються дельтараном і мелатоніном, що виявляється у потенціюванні їх дії при сумісному використанні.

Результати свідчать про доцільність досліджень ролі центральних механізмів регуляції циклу неспання спання у виникненні ЕКД, а також створюють передумови до використання дельтарану та мелатоніну в комплексному лікуванні хворих на алергічний дерматит.



Вплив комплексної фармакологічної корекції на показники функціональної стабільності лейкоцитів у щурів із експериментальним: I – показники пошкодження нейтрофілів; II – показники пошкодження лімфоцитів; 1 – контроль, 2 – дельтаран, 3 – дерматит і введення дельтарану, 4 – дерматит, введення дельтарану і мелатоніну, 5 – дерматит і введення мелатоніну. * $P < 0,05$ та *** $P < 0,001$ – вірогідні розбіжності досліджуваних показників порівняно з відповідними показниками в контрольній групі щурів; # $P < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваних показників порівняно з відповідними показниками в групі щурів із ЕКД без лікування; ** $P < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваних показників порівняно зі значеннями у групах щурів із ЕКД та роздільним введенням дельтарану та мелатоніну відповідно

А.А. Шандра

ВЛИЯНИЕ ДЕЛЬТАРАНА И МЕЛАТОНИНА НА СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОНТАКТНОГО ДЕРМАТИТА

Целью работы было изучение активности гуморального и клеточного звеньев иммунитета, а также показателей функциональной стабильности лейкоцитов у крыс с экспериментальным контактным дерматитом (ЭКД) в условиях комплексной фармакологической коррекции введениями дельтарана и мелатонина. Исследования проводили в условиях хронического эксперимента на модели хроминдуцированного ЭКД. Для комплексной фармакологической коррекции показателей гуморального и клеточного звеньев иммунитета, а также стабильности лейкоцитов использовали отдельные и сочетанные введения дельтарана и мелатонина. Полученные результаты показали, что в условиях хроминдуцированного ЭКД у крыс отмечаются выраженные нарушения гуморального и клеточного звеньев иммунитета, а также нарушается функциональная стабильность нейтрофилов и лимфоцитов. Выявленные изменения функциональной активности иммунной системы регистрировали в условиях совместного применения дельтарана и мелатонина. При этом активность лечебного комплекса имела потенцирующий характер.

Ключевые слова: экспериментальный контактный дерматит, иммунологическая реактивность, показатель повреждения нейтрофилов, показатель повреждения лимфоцитов, дельтаран, мелатонин, фармакологическая коррекция

О.О. Shandra

THE INFLUENCE DELTARAN AND MELATONIN ON IMMUNE SYSTEM IN RATS, WHICH WAS AFFECTED BY EXPERIMENTAL CONTACT DERMATITIS

The aim of the work was investigation of both humoral and cell-mediated immunity together with leukocytes functional stability indexes in rats with the experimental contact dermatitis (ECD) in conditions of complex pharmacological correction using deltaran and melatonin. Experimental trials were performed under conditions of chronic experiment on model chrome-induced ECD. Both deltaran and melatonin either alone or in combination were used for complex pharmacological correction of humoral and cell-mediated immunity and also for stability of leukocytes. The data obtained showed the expressed disturbances of humoral and cell-mediated im-

munity and neutrophils' functional stability damage under conditions of chrome-induced ECD in rats. The revealed alterations in functional activity of the immune system were successfully corrected using the combined administration of deltaran and melatonin. The activity of medical complex had exponential character.

Key words: experimental contact dermatitis, immune reactivity, neutrophil' alteration index, lymphocyte' alteration index, deltaran, melatonin, pharmacological correction.

Odessa National Medical University

REFERENCES

1. Koryakina O. V., Kovtun O. P., Tuzankina I. A. Immunological status of children with epilepsy and the possibility of using delta - sleep inducing peptide with the aim of immunomodulation. System integration in healthcare. 2008; **1** (1): 17-22.
2. Kalinichenko L. S., Pertsov S. S., Koplik E. V. Effect of melatonin on serum cytokine profile in rats with different parameters of behavior in acute emotional stress. Bulletin eksp.biol.med. 2013; **11**: 569-573.
3. Lebedyuk M. N., Shandra A. A. The peculiarities of sleep-wake cycle in rats with modelling contact dermatitis. Integr.Anthropology. 2010; **2** (16): 58 – 62.
4. Mamyrbayev A. A. Toxicology of chromium and its compounds. 2012; Aktobe, Kazakhstan. 284.
5. Raben A. S., Alekseeva O. G., Duyeva L. A. Experimental allergic contact dermatitis. M.: Medical. 1970; 190.
6. Chernushenko E. F., Kogosova L. S. Immunology and Immunopathology of lung diseases. K.: Health. 1981; 208.
7. Irwin M. Effects of sleep and sleep loss on immunity and cytokines. Brain, Behavior, and Immunity. 2002; **16**: 503–512.
8. Ivanova E. A., Koplik E.V. Changes in duodenal lymphoid structures in rats with different levels of behavioral activity treated with delta sleep-inducing peptide and during acute emotional stress. Neuroscience and Behavioral Physiology. 2011; **41** (5): 515-519.
9. Favor C. Lytic effect bacterial products on lymphocytes of tuberculous clinics. Z. Immunol. Forsch. 1969; **137**(1-3): 249-254.
10. Mishima K. Melatonin as a regulator of human sleep and circadian systems. Nihon Rinsho. 2012; **70**(7):1139-1144.
11. Lin G.J., Huang S.H., Chen S.J. et al. Modulation by melatonin of the pathogenesis of inflammatory autoimmune diseases. 2013; **14** (6): 11742-11766.

Одеськ. нац. мед. ун-т

E-mail: shandra@tm.odessa.ua

Матеріал надійшов до редакції 19.08.2013