

## ВОЗДЕЙСТВИЕ МЕЛАКСЕНА НА ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА И АКТИВНОСТЬ МАРКЕРНЫХ ФЕРМЕНТОВ ПОРАЖЕНИЯ ГЕПАТОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С НЕАЛКОГОЛЬНЫМ СТЕАТОГЕПАТИТОМ, РАЗВИВАЮЩИМСЯ НА ФОНЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА

С. С. Попов<sup>1</sup>, А. Н. Пашков<sup>1</sup>, А. А. Агарков<sup>2</sup>, К. К. Шульгин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко»

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 05.08.2015 г.

**Аннотация.** Проведена оценка действия мелаксена на динамику изменений основных классов иммуноглобулинов – IgA, IgM, IgG, концентрацию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), а также активность маркерных ферментов поражения гепатоцитов у пациентов с неалкогольным стеатогепатитом, развивающимся на фоне сахарного диабета 2 типа. Установлено, что развитие патологии сопровождается диссиммуноглобулинемией (у 87% больных), повышенной по сравнению с нормой концентрацией ЦИК, а также возрастанием активности АлАт, АсАт и  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы. При включении в базисное лечение препарата мелаксен отмечалось более выраженное изменение исследуемых параметров в сторону контрольных значений. Данные о положительном воздействии исследуемого препарата свидетельствуют о возможности проявления мелатонином иммуномодулирующей и гепатопротекторной активности, что соотносится с представлениями об адаптогенной роли эпифиза в целом.

**Ключевые слова:** неалкогольный стеатогепатит, сахарный диабет 2 типа, иммуноглобулины, циркулирующие иммунные комплексы, аминотрансферазы, мелаксен.

**Abstract.** The estimation of the melaxen action on the dynamics of changes of major classes of immunoglobulins - IgA, IgM, IgG, concentration of circulating immune complexes (CIC) and the activity of marker enzymes of hepatocytes injury at patients with non-alcoholic steatohepatitis, developing at diabetes mellitus of type 2 has been carried out. It was found that the development of the pathology is accompanied by dissimmunoglobulinemia (in 87% of patients), increasing of the CIC concentration compared with the norm as well as an enlargement of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase activities. At the melaxen incorporation to the basic treatment it noted a more pronounced change of investigated parameters to the side of the control values. The data on the positive impact of the study drug evidence on the possibility of melatonin immunomodulatory and hepatoprotective activities that corresponds with the notion of adaptogenic role of the pineal gland as a whole.

**Keywords:** non-alcoholic steatohepatitis, type 2 diabetes mellitus, liver, immunoglobulins, aminotransferases, melaxen.

Мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин) является нейропептидом, синтезируемым в эпифизе и клетках диффузной нейроэндокринной системы. По химической структуре он представляет собой производное биогенного амина серотонина, который, в свою очередь, синтези-

руется из аминокислоты триптофана, поступающего с пищей. Данный гормон главным образом участвует в регуляции суточного периодизма и циклических процессов. Мелатонин связывает свободные радикалы кислорода, одновременно индуцируя естественную систему антиоксидантной системы организма. Обладая собственным антиоксидантным действием, мелатонин действует повсеместно, проникая через биоло-

гические мембраны. [1]. Нами были проведены исследования влияния мелатонина на свободно-радикальный гомеостаз у крыс с заболеваниями, сопровождающимися окислительным стрессом, которые убедительно свидетельствуют о позитивном антиоксидантном эффекте действия данного гомона [2-4].

Мелатонин также играет существенную роль в иммунорегуляции и способен оказывать двойственное влияние на функцию иммунной системы, а именно на фоне ее угнетения оказывать стимулирующее действие, а при гиперактивности тормозить образование цитокинов и функции активированных макрофагов, Т-хелперов. Несмотря на многочисленные исследования, вопрос о взаимосвязи иммунных сдвигов в организме с метаболическими нарушениями у пациентов с сахарным диабетом, не ясен.

В данной работе эффективность действия экзогенного мелатонина, а именно лекарственного препарата – мелаксен, содержащего в своем составе мелатонин, на иммунный статус и активность маркерных ферментов поражения гепатоцитов была изучена при лечении больных с неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ), развивающимся при сахарном диабете 2 типа (СД2). Этиология неалкогольного стеатогепатита многофакторна и включает, в первую очередь, следующие причины: ожирение; сахарный диабет 2 типа; гиперлипидемию [5].

Целью настоящей работы явилась оценка иммунных показателей – уровня циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), сывороточных иммуноглобулинов классов А, М, G, а также активностей ферментов, характеризующих функционирование печени (аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспаргатаминотрансферазы (АсАТ) у больных НАСГ, развивающимся на фоне СД2, при комбинированном лечении с мелаксеном.

### **МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА**

В клиническое исследование было включено 59 человек с НАСГ, возникшим на фоне СД2. Среди них 21 мужчина (37.9%) и 38 женщин (62.1%). Возраст больных составлял от 38 до 75 лет: средний возраст – 56.5±17.5 года. Средняя продолжительность заболевания СД2 составляла 3.6±2.7 года. Диагноз неалкогольного стеатогепатита был поставлен на основании клинических признаков заболевания, биохимического исследования крови, данных ультразвукового исследования печени. Из сопутствующих заболеваний чаще всего реги-

стрировались следующие: ожирение – 59 больных (100%), гипертоническая болезнь – 55 больных (93.2%), хроническая сердечная недостаточность – 49 больных (83.1%), хронический гастрит – 32 больных (54.2%).

Критериями исключения из исследования являлись: вирусные гепатиты, злокачественные новообразования, острый инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения, хроническая почечная недостаточность.

Больные были разделены на 2 группы. Первая группа пациентов (33 человека) находилась на базисном лечении: сахароснижающая терапия (таблетированные препараты сульфонилмочевины и бигуаниды), витамины – В1, В6, В12 (5% растворы по 1 мл внутримышечно 1 раз в день), гепатопротекторы: карсил (эквивалент силимарина, 35 мг) по две таблетки 3 раза в день во время еды, эссливер форте (эссенциальные фосфолипиды, 300 мг) по две таблетки 3 раза в день, антигипертензивная терапия (ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента – эналаприл, 10 мг) по одной таблетке 1 раз в день, в течение 10 дней. Вторая группа пациентов (26 человек) дополнительно к базисной терапии получала мелаксен (Unifarm, Inc., США) по одной таблетке, содержащей 3 мг мелатонина и вспомогательные вещества., 1 раз в день за 30-40 минут перед сном в течение 10 дней.

Принцип используемого метода определения активностей аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспаргатаминотрансферазы (АсАТ) заключается в фотометрическом определении содержания пирувата или оксалоацетата в пробе на основе реакции с 2.4-динитрофенилгидразином. В качестве исследуемого материала использовалась свежая сыворотка крови без следов гемолиза.

Количественное определение сывороточных иммуноглобулинов классов А, М, G осуществлялось методом иммуноферментного анализа (ИФА), в основе которого лежит принцип взаимодействия иммуносорбента — антигена возбудителя инфекции — с выявляемыми антителами и в соединении этого комплекса антиген-антитело с иммуноглобулинами, содержащим ферментную метку [6]. Циркулирующие иммунные комплексы, представляющие собой растворимые комплексы антиген-антитело, определяли спектрофотометрическим методом [7].

В ходе работы использовали следующие реагенты: наборы для определения иммуноглобулинов (Cusabio, Китай), АлАТ, АсАТ (Витал,

Россия), остальные реактивы отечественного производства марки «хч» или «чда».

Статистическая обработка материала включала в себя использование стандартных методов вариационной статистики (расчет средних значений (M), ошибка средних значений (m), t-критерия Стьюдента) и непараметрического теста Вилкоксона с использованием прикладных программ «STATISTICA 6.0». Достоверными считались различия при  $p \leq 0.05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Состояние функции печени у больных первой и второй групп до лечения по сравнению с контрольной группой характеризовалось возрастанием уровня активности АлАт в 1.7 ( $p < 0.05$ ) и 1.6 ( $p < 0.05$ ) раза соответственно по сравнению с верхней границей нормы (40 ЕД) (рис. 1). Для уровня АсАт также было характерно увеличение: в 1-ой группе в 1.3 ( $p < 0.05$ ) раза, во 2-ой группе в 1.2 ( $p < 0.05$ ) раза по сравнению с верхней границей нормы (40 ЕД) (рис. 1). Данные биохимические показатели подтверждают, что у больных с НАСГ, развивающимся на фоне СД2, происходило нарушение метаболизма и повреждение гепатоцитов, что сопровождалось цитолизом клеток и

выходом в кровь аминотрансфераз. После базисного лечения гепатопротекторами наблюдалось уменьшение активности АлАт и АсАт в 1.8 и 1.4 ( $p < 0.05$ ) раза соответственно (рис. 1). После комбинированного лечения с мелаксеном происходило снижение активности АлАт и АсАт в большей степени – в среднем в 2.0 ( $p < 0.05$ ) и 1.6 ( $p < 0.05$ ) раза соответственно (рис. 1).

Полученные в ходе наших исследований результаты свидетельствуют о повышенной по сравнению с нормой концентрации ЦИК в крови пациентов с НАСГ. У больных первой группы содержание ЦИК превышало контрольный уровень в 3.2 ( $p < 0.05$ ) раза (Таблица 1). После проведения базисного лечения концентрация ЦИК снижалась в среднем в 1.4 ( $p < 0.05$ ) раза, что, по-видимому, было связано с положительными сдвигами в протекании метаболических процессов в организме в результате компенсаторных изменений, происходящих под влиянием сахаропонижающей терапии и гепатопротекторов.

Во второй группе больных изменения содержания ЦИК характеризовались значениями подобными соответствующему показателю в первой группе пациентов. При включении мелаксена в базисную терапию уровень ЦИК уменьшался в

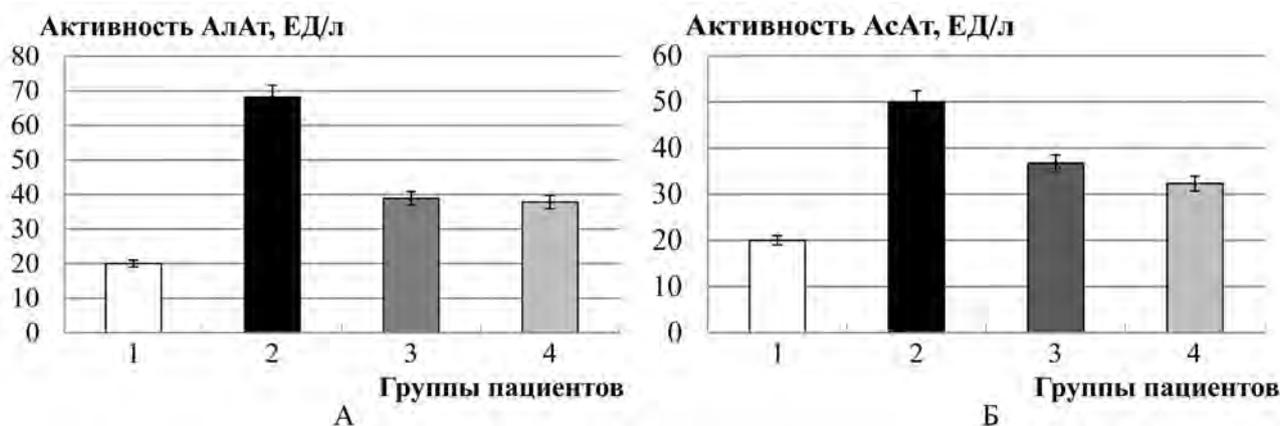


Рис. 1. Активность АлАт (а) и АсАт (б) у пациентов в норме (1), при НАСГ, развивающимся при СД2 (2), при проведении базисного лечения (3) и комбинированной терапии с мелаксеном (4).

Таблица 1.

Изменения содержания сывороточных иммуноглобулинов и циркулирующих иммунных комплексов у пациентов с НАСГ, развивающимся при СД2, при проведении базисного лечения и комбинированной терапии с мелаксеном

Показатели	Единицы измерения	Контрольная группа (n=27)	1-ая группа (базисное лечение; n=33)		2-я группа (комбинированная терапия с мелаксеном; n=26)	
			До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Ig A	г/л	2.9±0.12	4.6±0.14*	4.2±0.12**	4.7±0.19*	3.8±0.11**
Ig M	г/л	1,8±0.05	2.1±0.16*	1.9±0.16**	2.2±0.17*	1.8±0.06**
Ig G	г/л	14.1±0.52	18.8±0.3*	17.8±0.4**	18.8±0.71*	17.2±0.77**
ЦИК	усл. ед.	72.3±2.61	231.4±8.3*	166.4±7.1**	239.2±8.9*	149.3±7.9**

Примечание: достоверность значений ( $p \leq 0.05$  \*) - по сравнению с нормой, (\*\*) - по сравнению с патологией

среднем в 1.6 ( $p < 0.05$ ) раза (Таблица). Данные о положительном воздействии мелаксена свидетельствуют о возможности проявления мелатониниммуномодулирующей активности, что соотносится с представлениями об адаптогенной роли эпифиза в целом. В основе иммуномодулирующего влияния гормона, по-видимому, может лежать его воздействие через специфические рецепторы  $MT_1$ ,  $MT_2$ , и  $MT_3$  на функцию клеток лимфоидных органов и клеточных элементов крови, а также опосредованное влияние через мобилизацию опиоидных механизмов и модификацию выработки кортикостероидов корой надпочечников [8].

В ходе проведенных исследований динамика изменений основных классов иммуноглобулинов – IgA, IgM, IgG, отмечена у 87% больных НАСГ, развивающимся на фоне СД2. Таким образом, полученные результаты указывают на то, что у большинства пациентов имели место нарушения иммунного статуса, проявляющиеся диссиммуноглобулинемией и повышением уровня ЦИК. Полученные данные могут объясняться аутоинтоксикацией организма и интенсификацией цитолитического синдрома при НАСГ.

Применение различных способов лечения приводило к изменению динамики уровня сывороточных иммуноглобулинов. Так, концентрация IgA, возрастающая при патологии в среднем в 1.6 ( $p < 0.05$ ) раза, снижалась после базисной терапии на 13.1%, а после комбинированной терапии с мелаксеном – на 23.7% (Таблица 1). Содержание IgG, которое в патологическом состоянии возрастало в среднем в 1.3 ( $p < 0.05$ ) раза по сравнению с нормой, снижалось после базисного лечения – на 5.2%, после комбинированного лечения с мелаксеном – на 9.5 ( $p < 0.05$ ) %. Уровень IgM, повышающейся в условиях патологии в среднем в 1.2 ( $p < 0.05$ ) раза, уменьшался после базисного лечения – на 10.5 ( $p < 0.05$ ) %; после комбинированного лечения с мелаксеном – на 22.2 ( $p < 0.05$ ) %. Полученные данные соотносятся с представлениями о возможном участии мелатонина в регуляции функций иммунной системы организма человека [9, 10]. Результаты проведенных исследований и имеющиеся литературные данные позволяют считать мелатонин универсальным эндогенным адаптером, способным участвовать в поддержании баланса иммунного статуса организма на определенном уровне. Имеются сведения, что основополагающую роль в иммунологическом распознавании чужеродных антигенов играют антитела подклассов G1-G3, запускающих каскад

молекулярных и клеточно-опосредованных механизмов защиты организма. Вместе с тем, секреция низкоавидных антител класса G с аномальной конформацией и, как следствие, низкой функциональной активностью приводит к негативным последствиям, включая формирование с антигеном растворимых длительно циркулирующих в крови иммунных комплексов, не способных активировать по классическому пути систему комплемента и, соответственно, включать клеточные механизмы защиты. Эти ЦИК, обладая цитофильностью, способны связываться с тканями. Полагают, что это может, в конечном счете, вести к гиперактивации В- и Т-звеньев иммунитета [11].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что использование мелаксена в базисном лечении НАСГ, развивающимся при СД 2 типа, приводило к наиболее выраженному терапевтическому эффекту. Это выражается в более значительном снижении активности АлАт и АсАт (маркеров повреждения гепатоцитов и их цитолиза у пациентов после лечения, включающего мелаксен. Кроме этого, при комбинированной терапии с мелаксеном отмечена более выраженная динамика к нормализации показателей иммунного статуса больных НАСГ по сравнению с группой пациентов, находящихся на традиционном лечении. Данные о положительном воздействии мелаксена свидетельствуют о возможности проявления мелатониниммуномодулирующей активности.

*Работа поддержана Стипендией Президента РФ молодым ученым № СП – 1606.2015.4.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans / J. R. Russel [et al.] // Acta Biochimica Polonica. — 2003. — Vol.50, №4. — P. 1129–1146 .
2. Оценка степени фрагментации ДНК, активности аконитатгидратазы и уровня цитрата при сахарном диабете 2 типа у крыс и введении мелатонина/ А.А. Агарков [и др.]// Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. — 2012. — №3. — С. 21–26.
3. Gorbenko M.V. The effect of melaxen and valdoxan on the activity of the glutathione antioxidant system in rats with experimental hyperthyroidism/ M.V. Gorbenko, T.N. Popova, K.K. Shulgin // Biochemistry (Moscow) Supplement. Series B:

Biomedical Chemistry. — 2013. — Т. 7. № 1. — С. 27–31.

4. De Carvalho M.A.A.P. The effects of some substances-protectors on free-radical homeostasis in diseases associated with oxidative stress/ M.A.A.P. De Carvalho, S.S. Popov, O.A. Safonova// Handbook of Free Radicals: Formation, Types and Effects. — 2010. — С. 291–303.

5. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity / B.R. Bacon [et al.] // Gastroenterology. — 1994. — Vol.107, №4. — P.1103–1109.

6. Management of obesity in adults: European clinical practice guidelines / C. Tsigos, [et al.] // Obesity Facts. — 2008. — Vol. 1, № 2. — P. 106–116.

7. Haskova V. Hový způsob stanovení circulačních imunokomplexů v lidských sérech / V. Haskova, J. Kaslík, I. Matl // Cas. Lek. Ces. — 1977. — Vol.116. — P. 436–437.

8. Different Expression of the Melatonin Receptor in Human Monocytes 1 / M.J. Barjavel

[et al.] // The Journal of Immunology. — 1998. — Vol. 160. — P. 1191–1197.

9. Мендель В.Э. Мелатонин: роль в организме и терапевтические возможности. Опыт применения препарата Мелаксен в российской медицинской практике / В.Э. Мендель, О.И. Мендель // РМЖ. — 2010. — № 6. — С.336–342.

10. Попов С.С. Воздействие эпифамина на показатели иммунного статуса, углеводного и липидного обмена у больных неалкогольным стеатогепатитом, развивающимся при сахарном диабете 2 типа/ С.С. Попов, А.Н. Пашков, А.А. Агарков // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. — 2014. — № 1. — С. 70.

11. Эфендиев А.М. Взаимосвязь биохимических показателей и avidности антител у больных сахарным диабетом 2 типа / А.М. Эфендиев, Г.И. Азизова, Г.Р. Гусейнова // Бюллетень сибирской медицины. — 2009. — №3. — С. 74-79.

*Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко*

*Попов С. С., кандидат медицинских наук, доцент кафедры госпитальной терапии и эндокринологии*

*E-mail: popov-endo@mail.ru*

*Тел.: +7(473) 257-96-78*

*Пашков А. Н., доктор биологических наук, профессор, Заведующий кафедрой биологии*

*E-mail: vgma-pashkov@yandex.ru*

*Тел.: (473) 253-04-13*

*Воронежский государственный университет*

*Агарков А. А., кандидат биологических наук, Ассистент кафедры медицинской биохимии и микробиологии*

*E-mail: agalalek@mail.ru*

*Тел.: (920) 453-17-72, доб. 1111*

*Шульгин К. К., кандидат биологических наук, Доцент кафедры медицинской биохимии и микробиологии*

*E-mail: kkshulgin@mail.ru*

*Тел.: (920) 453-17-72, доб. 1111*

*Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko*

*Popov S. S., Doctor of Medicine, Associate Professor, Dept. of Hospital Therapy and Endocrinology*

*E-mail: popov-endo@mail.ru*

*Ph.: +7 (473) 257-96-78*

*Pashkov A. N., PhD, Sc.D., Full Professor, Head of the Department of Biology*

*E-mail: vgma-pashkov@yandex.ru*

*Ph.: (473) 253-04-13*

*Voronezh State University*

*Agarkov A. A., Ph.D., Assistant Professor, Department of Medical Biochemistry and Microbiology*

*E-mail: agalalek@mail.ru*

*Ph.: (920) 453-17-72, ext. 1111*

*Shulgin K. K., Ph.D., Associate Professor, Department of Medical Biochemistry and Microbiology*

*E-mail: kkshulgin@mail.ru*

*Ph.: (920) 453-17-72, ext. 1111*