

АНТИОКСИДАНТНО-ПРООКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС КРОВИ И КОЖИ БЕЛЫХ КРЫС С ДЕРМАТИТОМ ПРОСТЫМ РАЗДРАЖИТЕЛЬНОМ КОНТАКТНЫМ ПРИ РАЗНЫХ СПОСОБАХ ЛЕЧЕНИЯ

Гребенникова С.В., Оксенюк О.С., Макляков Ю.С., Калмыкова Ю.А.,
Смирнова О.Б.

Ростовский государственный медицинский университет фармакологии, Ростов-на-Дону, e-mail: svetgrva@yandex.ru

Цель: оценить влияние препаратов, содержащих омега-3 и омега-6 полиненасыщенные жирные кислоты, в сравнении со средствами противовоспалительного действия на состояние показателей окислительного стресса крыс с дерматитом простым раздражительным контактным. В сыворотке крови и гомогенатах кожи 61 крысы с дерматитом простым раздражительным контактным, инициированным ожоговой травмой, определяли содержание малонового диальдегида, активность супероксиддисмутазы и каталазы до и после лечения разных групп животных инъекциями Омегавена и наружно кремом «Витамин Ф 99» жирный, содержащими омега-3 и омега-6 полиненасыщенные жирные кислоты, и Радевит мазью. Наиболее благоприятной оказалась динамика показателей свободнорадикального окисления липидов и ферментативной антиоксидантной системы после лечения Омегавеном и кремом «Витамин Ф 99» жирный в сравнении с Радевит мазью. Показано преимущество восстановления сбалансированности про- и антиоксидантных параметров крови и кожи крыс с дерматитом простым раздражительным контактным, леченным средствами, содержащими омега-3 и омега-6 полиненасыщенные жирные кислоты, относительно действия стандартной терапии.

Ключевые слова: дерматит простой раздражительный контактный, свободнорадикальное окисление липидов, антиоксидантная система, полиненасыщенные жирные кислоты.

ANTIOXIDANT-PROOXIDANT BALANCE OF BLOOD AND SKIN OF WHITE RATS WITH IRRITANT CONTACT DERMATITIS WITH THE DIFFERENT METHODS OF TREATMENT

Grebennikova S.V., Oksenyuk O.S., Maklyakov Yu.S., Kalmykova Y.A.,
Smirnova O.B.

Rostov state medical University, Rostov-on-Don, e-mail: svetgrva@yandex.ru

Objective: To evaluate the influence of drugs, containing omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids, in comparison with the means anti-inflammatory effect on oxidative stress parameters in rats with dermatitis Irritant contact. The blood serum and skin homogenates of 61 rats with dermatitis Irritant contact initiated by burn injury, determined determined the content of monovoltine, the activity of superoxide dismutase and catalase before and after treatment of different groups of animals injections Omegaven and externally cream "Vitamin F 99" fat containing omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids, and Radevit ointment. The most favorable was dynamics of free-radical oxidation of lipids and the enzymatic antioxidant system after treatment with Omegaven and cream "Vitamin F 99" fat compared to Radevit ointment. The advantage of restoring balance between pro- and antioxidant parameters of blood and skin of rats with the irritable contact dermatitis, treatment agents containing omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids, the action of the standard therapy.

Keywords: Irritant contact dermatitis, free radical oxidation of lipids, antioxidant system, polyunsaturated fatty acids.

В настоящее время проблема лечения воспалительных заболеваний кожи продолжает оставаться весьма актуальной. Развитие окислительного стресса, сопровождающееся интенсификацией свободнорадикальных процессов и снижением естественной антиоксидантной защиты организма, является важным патогенетическим звеном многих заболеваний, в том числе и кожных [1-4]. Однако не только дисбаланс антиоксидантной и прооксидантной систем, но и нарушение соотношения сопряженных ферментов-

антиоксидантов может приводить к усилению окислительного стресса за счёт дополнительной генерации активных форм кислорода. В связи с этим особого внимания заслуживают способы лечения, направленные на сбалансирование окислительно-восстановительного гомеостаза и антиоксидантного статуса при заболеваниях кожи, в патогенезе которых существенна роль воспаления.

Весьма перспективным в этом плане представляется использование средств, содержащих омега-3 и омега-6 полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), являющихся важными регуляторами ряда физиологических процессов в организме [5].

Полиеновые жирные кислоты, входящие в состав фосфолипидов клеточных мембран, являются главной мишенью для кислородных радикалов, инициирующих процесс перекисного окисления липидов, ведущий к глубоким нарушениям структурно-функционального состояния клеточных мембран. Среди продуктов перекисного окисления липидов необходимо отметить малоновый диальдегид (МДА), стабильный поперечносшивающий бифункциональный вторичный интермедиат, способный образовывать комплексы с молекулами ферментов и рецепторов липидного бислоя.

Процессу перекисного окисления липидов в организме противостоит антиоксидантная система, важнейшими ферментативными компонентами которой являются супероксиддисмутаза (СОД) и каталаза (КАТ), совместное действие которых обеспечивает детоксикацию потенциально опасных активных форм кислорода – супероксид анион-радикала и перекиси водорода.

Острое течение воспалительных заболеваний кожи, проявляющееся эритемой и зудящими высыпаниями, может быть вызвано, в частности, ожоговой травмой. При этом воспалительная реакция сопровождается увеличением образования активных форм кислорода, обусловленного ростом активности нейтрофилов, мигрирующих в зону повреждения кожного покрова.

Целью данного исследования явилась оценка влияния препаратов, содержащих омега-3 и омега-6 ПНЖК, в сравнении со средством стандартной терапии, на состояние показателей окислительного стресса белых крыс с дерматитом простым раздражительным контактным (ДПРК).

Материалы и методы исследования

Экспериментальное исследование выполнено на белых крысах-самках линии Wistar массой 300–350 г. с соблюдением Международных принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных и с учётом норм и правил биомедицинской этики [с разрешения этического комитета РостГМУ (протокол № 16/13 от 14.11.2013 г.)].

Крысы содержались в условиях вивария на стандартном рационе. Моделирование ожога и эвтаназия (декапитация) выполняли с предварительным обезболиванием [6]. У 40 животных, кожу которых предварительно эпилировали, вызывали «выраженную ожоговую травму» (эксперимент 1) с помощью металлической пластины площадью 3,8 см² и толщиной в 1,5 мм, которую предварительно нагревали на электрической плитке с закрытой спиралью до 200 °С (начальные проявления покраснений покрывающей спираль металлической части) и затем накладывали на кожу в передней области спины в течение 3-х сек. У 21 животного вызывали «умеренную ожоговую травму» (эксперимент 2): аналогично разогретую металлическую пластину до контакта с кожей охлаждали до 120 °С. В результате ожога у крыс развивался ДПРК [7].

Животные были разделены на 5 групп, из которых: 1-я – контрольная – 20 интактных крыс, 2-я, 3-я и 4-я – опытные по 17 животных (10 – с «выраженной ожоговой травмой», 7 – с «умеренной ожоговой травмой»). Среди этих групп: 2-я – без лечения в течение 4-х дней после ожога, остальные – с лечением в течение 11 дней путём ежедневного воздействия на очаг поражения Радевит мазью (3-я группа) и кремом «Витамин Ф 99» жирный (4-я группа). 5-я опытная группа – 10 крыс с «выраженной ожоговой травмой», которых лечили комплексно Омегавеном внутривнутрибрюшинно по 1,0 мл и наружно Кремом «Витамин Ф 99» жирный.

Радевит мазь, официально рекомендованная для лечения контактных дерматитов и ожогов, обладает противовоспалительным действием. Омегавен имеет в составе омега-3 и омега-6 ПНЖК, активным веществом крема «Витамин Ф 99» жирный является витамин F – источник незаменимых ПНЖК и эфиров омега-3 жирных кислот.

Для биохимического анализа использовали сыворотку крови и гомогенаты кожи, в которых определяли содержание МДА в тесте с тиобарбитуровой кислотой [8], активность СОД (КФ1.15.1.1.) по торможению автоокисления адреналина в карбонатном буфере при pH 10.2 [9] и активность КАТ (КФ1.11.1.6) по степени ингибирования образования пероксидов аммония [10]. Измерения проводили на спектрофотометре Hitachi U-29 (Япония). На основании полученных абсолютных величин вычисляли относительное содержание МДА, СОД и КАТ в процентах от соответствующих контрольных показателей. Затем оценивали соотношение антиоксиданты/прооксиданты (коэффициент $K_1 = \text{СОД, \%} / \text{МДА, \%}$) и сбалансированность ферментов-антиоксидантов (коэффициент $K_2 = \text{СОД, \%} / \text{КАТ, \%}$).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием параметрических методов анализа по t-критерию Стьюдента. Достоверными считали различия между группами при $P < 0,05$.

Результаты исследования

Первый этап работы включал определение показателей окислительного стресса и их соотношений в крови животных с ДПРК, вызванным «выраженной ожоговой травмой» при двух методах лечения: Радевит мазью и с использованием средств, содержащих омега-3 и омега-6 ПНЖК (Омегавен и крем «Витамин Ф 99» жирный).

Как показали результаты исследования, развитие «выраженной ожоговой травмы» привело к снижению в крови животных 2-й группы активности ферментов АОЗ: СОД в 2,0 раза ($P<0,001$), КАТ в 1,3 раза ($P<0,05$) на фоне тенденции к увеличению МДА (в 1,1 раза) по сравнению с контролем (табл. 1). При этом существенно изменились соотношения СОД/МДА и СОД/КАТ до 0,44 и 0,66 отн. ед. соответственно. Такое нарушение сбалансированности между антиоксидантной и прооксидантной системами, с одной стороны, и между компонентами ферментативной антиоксидантной защиты, с другой стороны, свидетельствует о развитии окислительного стресса в основном за счёт истощения способности СОД к устранению супероксидных анион-радикалов.

Таблица 1

Компоненты свободнорадикального окисления липидов крови крыс при различных методах лечения (выраженная ожоговая травма), $M \pm m$.

Группы животных	МДА		СОД		КАТ		К ₁ , отн. ед.	К ₂ , отн. ед.
	нмоль/мл	%	усл.ед./мл	%	ЕД /мин/мл	%		
1-я (n=20)	6,23±0,44	100,0	23,83±1,57	100,0	44,31±3,47	100,0	1,00	1,00
2-я (n=10)	7,06±0,47	113,3	11,81±1,09*	49,56	33,55±1,45*	75,72	0,44	0,66
3-я (n=10)	8,80±0,39* [■]	141,3	32,30±5,80 [■]	135,5	38,60±0,91 [■]	87,11	0,96	1,56
5-я (n=10)	7,88±0,65	126,5	33,42±7,40 [■]	140,2	48,60±2,79 [■] [▲]	109,7	1,11	1,28

Примечание: * – статистически значимые различия с контрольной группой, [■] – с группой 2, [▲] – с группой 3.

У животных 3-й группы, получавших в течение 11 дней местное лечение Радевит мазью, отмечено возрастание содержания МДА, активности СОД и КАТ по сравнению со 2-й группой в 1,3 раза ($P<0,05$), в 2,7 раза ($P<0,001$) и 1,2 раза ($P<0,05$) соответственно. Однонаправленный характер изменений данных показателей отразился на их сбалансированности. Так, соотношение СОД/МДА, численно равное 0,96 отн. ед., практически нормализовалось, а соотношение СОД/КАТ оставалось повышенным до 1,56 отн. ед., т.е. имел место дисбаланс в антиоксидантной системе.

У животных 5-й группы, получавших комплексное лечение средствами, содержащими омега-3 и омега-6 ПНЖК, уровень МДА достоверно не отличался от такового во 2-й группе, активность ферментов увеличилась: СОД в 2,8 раза ($P<0,05$), каталазы в 1,5 раза ($P<0,001$) по сравнению с группой без лечения. Активность каталазы возросла в 1,3 раза ($P<0,01$) и при

сопоставлении с 3-й группой, соотношение СОД/КАТ уменьшилось до 1,28 отн. ед., что свидетельствует о выраженной направленности в сторону его нормализации. Коэффициент СОД/МДА также приблизился к контрольному показателю, составив 1,11 против 1,0 отн. ед.

Таким образом, наиболее эффективным в отношении восстановления сбалансированности показателей окислительного стресса в крови крыс оказалось лечение ДПРК сочетанием Омегавена и крема «Витамин Ф 99» жирный. Такой позитивный результат можно объяснить влиянием содержащихся в использованных лечебных средствах омега-3 и омега-6 ПНЖК.

На втором этапе работы мы оценивали антиоксидантно-прооксидантный статус в гомогенатах кожи животных с ДПРК, вызванном «выраженной ожоговой травмой» (эксперимент 1) и «умеренной ожоговой травмой» (эксперимент 2) при сравнительном лечении Радевит мазью и кремом «Витамин Ф 99» жирный. Результаты представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

Показатели свободнорадикального окисления липидов пораженной кожи крыс при дерматите простом раздражительном контактом (выраженная ожоговая травма), $M \pm m$.

Группы животных	МДА		СОД		КАТ		К ₁ , отн.ед.	К ₂ , отн.ед.
	нмоль/мл	%	усл.ед./мл	%	ЕД /мин/мл	%		
1-я (n=20)	63,15± 4,98	100,0	589,6 ± 31,7	100,0	20,50±1,49	100,0	1,00	1,00
2-я (n=10)	147,9± 8,5*	234,2	453,0± 48,0*	76,83	30,84±1,28*	150,4	0,33	0,51
3-я n=10	164,1±12,1*	259,9	470,1± 91,7	79,73	30,49±1,85*	148,7	0,31	0,54
4-я (n=10)	142,6± 14,6*	225,8	597,6±27,9 [■]	101,4	33,92±1,12*	165,5	0,45	0,61

Примечание: * – статистически значимые различия с контрольной группой; [■] – с группой 2.

Содержание МДА в гомогенатах кожи у животных 2-й группы как с «выраженной ожоговой травмой», так и с «умеренной» увеличено по сравнению с контролем в 2,3 раза ($P < 0,01$) и в 1,7 раза ($P < 0,05$) соответственно, при этом обнаружено превалирование в 1,4 раза ($P < 0,05$) показателя в эксперименте 1, что подтверждает зависимость интенсивности свободнорадикального повреждения кожного покрова от степени тяжести ожоговой травмы. Полученные результаты согласуются с данными литературы о нарастании количества диеновых конъюгатов и ТБК-активных продуктов в крови крыс при ожогах 3–4 степени тяжести относительно ожогов 1–2 степени [11]. Обнаруженный нами прирост содержания МДА в гомогенатах кожи подтверждается данными об увеличении уровня этого продукта во внутренних органах крыс, особенно в лёгких и почках, на стадии ожогового шока [12], что может указывать на наличие системного окислительного стресса.

Свободнорадикальное окисление липидов кожи крыс при дерматите простым
раздражительном контактном (умеренная ожоговая травма), $M \pm m$.

Группы животных	МДА		СОД		КАТ		К ₁ , отн.ед.	К ₂ , отн.ед.
	нмоль/мл	%	усл.ед./мл	%	ЕД /мин/мл	%		
1-я (n=20)	63,15± 4,9	100,0	589,6 ± 31,7	100,0	20,50 ±1,49	100,0	1,00	1,0
2-я (n=7)	107,4 ±11,2*	170,1	468,2± 69,4	79,41	33,78±1,70*	164,8	0,47	0,48
3-я (n=7)	113,2±24,6	179,3	531,6± 95,1	90,16	30,92±1,03*	150,8	0,50	0,60
4 -я (n=7)	139,6±16,3*	221,1	682,2±44,7 [■]	115,7	29,90±1,80*	145,9	0,52	0,79

Примечание: * – статистически значимые различия с контрольной группой, [■] – с группой 2.

Как видно из таблиц 2 и 3, активность СОД снижена в 1,3 раза в гомогенатах кожи животных с ожоговой травмой без лечения по сравнению с контролем при двух вариантах эксперимента, при этом достоверное изменение показателя ($P < 0,05$) характерно только для крыс с «выраженной ожоговой травмой». Дисбаланс соотношения СОД/МДА более проявился также в эксперименте 1, составив 0,33 отн. ед. против 0,47. Активность каталазы была повышена при 1 и 2 вариантах в 1,5 раза ($P < 0,001$) и 1,7 раза ($P < 0,001$), а отношение СОД/КАТ равнялось 0,51 и 0,48 отн. ед. соответственно. Выявленное разнонаправленное изменение активностей ферментов-синергистов свидетельствует о нарушении баланса СОД/КАТ в очаге поражения.

Лечение животных 3-й и 4-й групп не способствовало снижению содержания МДА при обоих вариантах эксперимента по сравнению с группой 2. Возможно, сохранение повышенного уровня МДА носит адаптивный характер, так как один из путей его метаболизма направлен в сторону липогенеза, стимуляция которого способствует активации репаративных процессов в гидрофобном слое клеточных мембран [13].

Результаты определения активности СОД в коже крыс 4-й группы по сравнению со 2-й показали достоверное возрастание в 1,3 раза при «выраженной ожоговой травме» и в 1,5 раза при «умеренной травме» только при способе лечения, основанном на применении крема «Витамин Ф 99» жирный. Поэтому дисбаланс в системе антиоксиданты/прооксиданты выражен менее сильно при воздействии средства, содержащего ПНЖК.

Активность каталазы оставалась достоверно повышенной по сравнению с контролем при двух способах лечения животных как с «выраженной ожоговой травмой», так и с «умеренной». Соотношение СОД/КАТ в 3-й и 4-й группах составило соответственно 0,54 и 0,61 отн. ед. в 1-м варианте эксперимента и 0,60 и 0,79 отн. ед. во 2-м варианте, то есть

нормализация в системе ферментативной антиоксидантной защиты проявилась в большей степени при лечении кремом «Витамин Ф 99» жирный.

Заключение

1. Экспериментальный ДПРК характеризуется развитием окислительного стресса, обусловленного нарушением сбалансированности антиоксидантной и прооксидантной систем и дисбалансом ферментов первой линии антиоксидантной защиты.
2. Проявлением данных нарушений является значительное снижение коэффициента СОД/МДА при «выраженной ожоговой травме» в основном за счёт угнетения супероксидустранивающей способности сыворотки крови и интенсификации процессов свободнорадикального окисления липидов в гомогенатах кожи.
3. Сдвиг равновесия СОД/КАТ при ДПРК связан с неравномерным снижением активности ферментов в крови и разнонаправленным изменением их действия в коже.
4. Применение Радевит мази для лечения кожного покрова способствует нормализации баланса антиоксиданты-прооксиданты только в крови экспериментальных животных.
5. Применение крема «Витамин Ф 99» жирный приводит к увеличению коэффициентов СОД/МДА и СОД/КАТ в коже при двух вариантах эксперимента.
6. Комплексное лечение ДПРК инъекциями Омегавена и наружно кремом «Витамин Ф 99» жирный является наиболее эффективным, что подтверждается нормализацией СОД/МДА, двукратным увеличением СОД/КАТ и достоверным возрастанием каталазной активности сыворотки крови по сравнению с показателем при лечении Радевит мазью.

Таким образом, нами доказано преимущество применения средств, содержащих омега-3 и омега-6 ПНЖК и обоснована целесообразность использования интегральных параметров окислительного стресса в качестве надёжных критериев совершенства патогенетической терапии ДПРК.

Список литературы

1. Касихина Е.И. Цитопротективная терапия в комплексном лечении хронических воспалительных заболеваний кожи /Е.И. Касихина // РМЖ дерматология. – 2015. – № 19. – С.1146-1149.
2. Zhou G. Oxidative stress in pathogenesis of psoriasis / G. Zhou, U. Mroviets, M. Rostami-Yzdi // Free Radic. Biol.Med. –2009. – Vol. 47. – P.891-905.
3. Овчар С.А. Биохимические аспекты регенераторной активности новых производных пиридина /С.А. Овчар, Ю.С. Макляков, Ю.А. Калмыкова, Е.В. Иванова // Биомедицина. – 2006. – № 4. – С. 100-102.

4. Гребенников В.А. Исследование свободнорадикального окисления при хронической крапивнице и антиоксидантная терапия / В.А. Гребенников, Г.Л. Абрамян, О.Б. Смирнова // Вестник дерматологии и венерологии. – 1995. – № 2. – С. 37.
5. Кеца О.В. Влияние полиненасыщенных жирных кислот на состояние ферментативной антиоксидантной системы печени крыс /О.В. Кеца, Х.М. Швед, О.А. Петрик // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2014. – № 11(1). – С. 39-43.
6. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М., 2010. – 358 с.
7. Amado A. Ирритантный контактный дерматит / A. Amado, J.S. Taylor, A. Sood // Дерматология Фицпатрика в клинической практике. – М., 2012. – Т. 1. – С. 430-437.
8. Стальная И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты /И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили //Современные методы в биохимии. – М.,1977. – С.66-68.
9. Mistra, H.P. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and simplassay for superoxide dismutase / H.P. Mistra, I. Fridovich // J. Biol. Chem. – 1972. – Vol. 247, № 10. – P.3170-3175.
10. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев //Лабораторное дело. – 1988. – №1. – С.16-18.
11. Кантюков С.А. Состояние процессов свободно-радикального окисления при термической травме разной степени тяжести / С.А. Кантюков, Л.В. Кривохижина, Р.Р. Фарфутдинов // Вестник ЮУрГУ. – 2010. – № 24. – С.117-124.
12. Нетюхайло Л.Г. Состояние антиоксидантной системы внутренних органов крыс при ожоговой болезни / Л.Г. Нетюхайло, Т.А. Сухомлин, Я.А. Басараб, В.В. Бондаренко, С.В. Харченко // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 51-56.
13. Швец В.Н. / Состояние ферментативного перекисного окисления липидов в сердце молодых и старых крыс при стрессе // В.Н. Швец, В.В. Давыдов // Вопросы медицинской химии. – 1995. – Т. 41, № 3. – С. 23-25.