

proinflammatory cytokines serum with the maximum expression at 12 hours after reperfusion. Combined use of natural analogues of prostaglandin E1, proteolysis inhibitors and antioxidants for medical correction of experimental reperfusion syndrome is accompanied by a more pronounced decrease in the total proteolytic activity, an increase in activity of proteinase inhibitors, reduced concentrations of key

pro-inflammatory cytokines in the serum compared with the effects of the use of only proteolysis inhibitors and antioxidants.

Keywords: ischemia, reperfusion, proteinase, cytokines, proteolysis inhibitors, antioxidants, prostaglandin E1.

*Впервые поступила в редакцию 12.05.2013 г.
Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования*

УДК 615.5-02:616-008.61-07

БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ВОСПАЛЕНИЯ И ДИСБИОЗА В КОЖЕ КРЫС С ИММУНОДЕФИЦИТОМ, КИШЕЧНЫМ ДИСБИОЗОМ И ДЕЙСТВИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

Шухтин В.В.¹, Гоженко А.И.¹, Левицкий А.П.², Шухтина И.Н.³

¹Украинский НИИ медицины транспорта (г. Одесса)

²ГУ "Институт стоматологии НАМН" (г. Одесса)

³Одесский национальный медицинский университет (г. Одесса)

Исследовали в коже крыс состояние воспаления (по уровню эластазы и малонового диальдегида), степень дисбиоза (по соотношению относительных активностей уреазы и лизоцима), уровень антиоксидантной защиты (по активности каталазы и антиоксидантно-прооксидантному индексу АПИ), а также содержание гиалуроновой кислоты. Моделировали иммунодефицит (ИД) с помощью циклофосфана, кишечный дисбиоз – с помощью линкомицина и эндотоксикоз – с помощью липополисахарида (ЛПС).

Установлено, что при всех трех воздействиях наблюдается развитие в коже дисбиоза и воспаления, обусловленное, по-видимому, снижением содержания гиалуроновой кислоты и ослаблением антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: кожа, иммунодефицит, дисбиоз, липополисахарид, воспаление, антиоксидантная система.

Нами ранее было показано, что при экспериментальном иммунодефиците (ИД), вызываемом с помощью цитостатика циклофосфана, в коже развивается воспаление и дисбиоз [1].

Известно, что причиной дисбиоза чаще всего является ИД [2, 3]. Известно также, что реализация патогенного действия на организм дисбиоза (прежде всего, кишечного) осуществляется, главным образом, за счет липополисахарида (ЛПС) – кишечного эндотоксина, образуемого Грам-отрицательными условно-патогенными и патогенными бактериями [4, 5].

Целью настоящего исследования стало сравнительное изучение патогенного действия на кожу крыс трех видов воздействия: иммунодефицита, кишечного дисбиоза и липополисахарида. Патогенное действие этих трех факторов оценивали по уровню биохимических маркеров воспаления (эластаза, малоновый диальдегид) и дисбиоза (уреаза, лизоцим, степень дисбиоза по Левицкому).

Материалы и методы исследования

Эксперименты были проведены на 24 белых крысах линии Вистар (самцы, 10

месяцев, 350 ± 12 г), разделенных на 4 равных группы: 1-ая – норма, 2-ая – экспериментальный ИД, который воспроизводили с помощью циклофосфана (производства ЗАО «Киевмедпрепарат», Украина) путем внутрибрюшинного введения в дозе 45 мг/кг два раза с интервалом в два дня, умерщвление на 8-й день; 3-я – экспериментальный дисбиоз, который воспроизводили с помощью линкомицина (производства ФК «Здоров'я», Украина) путем введения с питьевой водой в дозе 60 мг/кг в сутки в течение 5 дней, умерщвление на 15-й день [6]; 4-ая – ЛПС из *E. coli* (производства «Sigma», США) внутрибрюшинно в дозе 50 мкг/кг в сутки в течение 8 дней, умерщвление на 9-й день.

Эвтаназию животных осуществляли в соответствии с требованиями Европейской конвенции [7] под тиопенталовым наркозом (20 мг/кг) путем тотального кровопускания из сердца.

Иссекали кожу с бедра, удаляли волосы и хранили до исследования при минус 30 °С. В гомогенате кожи (50 мг/мл 0,05 М трис-НСl-буфера рН 7,5) определяли уровень маркеров воспаления [8]: активность эластазы [9] и концентрацию малонового диальдегида (МДА) [10]; активность антиоксидантного фермента каталазы [11], активность уреазы (показатель микробной обсемененности) [12], активность лизоцима (показатель неспецифического иммунитета) – бактериолитическим методом [12]. По соотношению активности каталазы и концентрации МДА рассчитывали антиокси-

дантно-прооксидантный индекс АПИ [8], а по соотношению относительных активностей уреазы и лизоцима – степень дисбиоза по Левицкому [13].

Кроме того, в гомогенате кожи определяли, а также содержание гиалуроновой кислоты турбидиметрическим методом по Клементу [14].

Результаты и их обсуждение

В таблице 1 представлены результаты определения в коже крыс уровня маркеров воспаления. Как видно из этих данных, активность эластазы достоверно повышается при всех видах моделирования патологии, но больше всего – при кишечном дисбиозе. В этой группе достоверно возрастает уровень и другого маркера воспаления – МДА, который лишь проявляет тенденцию к увеличению при ИД и практически не изменяется при действии ЛПС.

Полученные данные свидетельствуют о том, что наблюдаемые при ИД изменения уровня маркеров воспаления могут быть обусловлены развитием дис-

Таблица 1

Уровень маркеров воспаления в коже крыс при ИД, дисбиозе и действии ЛПС

№№ п/п	Группы	Эластаза, мк-кат/кг	МДА, ммоль/кг
1	Норма	$9,8 \pm 0,7$	$5,2 \pm 0,4$
2	ИД (7 сут.)	$15,1 \pm 1,0$ $p < 0,01$	$6,3 \pm 0,5$ $p > 0,05$
3	Дисбиоз (14 сут.)	$17,9 \pm 1,5$ $p < 0,001$	$9,7 \pm 0,6$ $p < 0,001$
4	ЛПС (8 сут.)	$17,0 \pm 1,3$ $p < 0,01$	$5,0 \pm 0,4$ $p > 0,8$

Примечание. p – показатель достоверности различий с группой «Норма».

Таблица 2

Активность каталазы и индекс АПИ в коже крыс с ИД, дисбиозом и действии ЛПС

№№ п/п	Группы	Каталаза, мкат/кг	АПИ, ед.
1	Норма	$0,7 \pm 0,05$	$1,37 \pm 0,11$
2	ИД (7 сут.)	$0,50 \pm 0,04$ $p < 0,05$	$0,79 \pm 0,09$ $p < 0,05$
3	Дисбиоз (14 сут.)	$0,56 \pm 0,05$ $p < 0,05$	$0,58 \pm 0,07$ $p < 0,01$
4	ЛПС (8 сут.)	$0,62 \pm 0,06$ $p > 0,1$	$1,24 \pm 0,11$ $p > 0,3$

Примечание. p – показатель достоверности различий с группой «Норма».

биоза, одним из проявлений которого является эндотоксикоз за счет воздействия ЛПС.

В таблице 2 представлены результаты определения в коже крыс активности каталазы и индекса АПИ. Как видно из этих данных, активность каталазы при всех трех моделируемых патологиях снижается (правда, при действии ЛПС $p > 0,1$). Также снижается и индекс АПИ, причем больше всего при дисбиозе, а меньше всего – при действии ЛПС. Эти данные свидетельствуют об ослаблении антиоксидантной системы кожи при ИД, возможно, за счет развития дисбиоза.

В таблице 3 представлены результаты определения в коже активности уреазы, лизоцима и степени дисбиоза. Как видно из этих данных, при всех видах моделируемой патологии значительно увеличивается активность уреазы, что свидетельствует о резком увеличении микробной обсемененности кожи. Напротив, активность лизоцима достоверно снижается, что указывает на значительное ослабление неспецифического иммуните-

та. Как следствие, мы наблюдаем многократное увеличение степени дисбиоза в коже, причем более всего при кишечном дисбиозе и несколько меньше при действии ЛПС и при ИД.

В таблице 4 представлены результаты определения содержания в коже гиалуроновой кислоты. Как видно из этих данных, при всех моделируемых патологиях происходит существенное снижение содержания гиалуроновой кислоты, которая является межклеточным «цементом», ограничивая проницаемость ткани для клеток, микробов и их токсинов. Следовательно, при ИД, дисбиозе и действии ЛПС за счет снижения содержания гиалуроновой кислоты существенно облегчается проникновение микробов в кожу [15].

Таким образом, проведенные исследования показали, что кожные проявления ИД могут быть обусловлены развивающимся при этом дисбиозом, в механизме патогенного влияния которого существенное место занимает эндотоксикоз за счет увеличения продукции кишечного эндотоксина.

В представленной схеме патогенеза кожных осложнений, возникающих у больных с ИД, показано, что последний вызывает дисбиоз (т. е. существенное превышение числа условно-патогенных микробов над пробиотическими) [16], который приводит к эндотоксикозу (главным образом, за счет увеличения концентрации ЛПС) [17]. Результатом эндотоксикоза является активация деструктивных, преимущественно гидролитических, процессов, в том числе а

Активность уреазы, лизоцима и степень дисбиоза в коже крыс с ИД, дисбиозом и действии ЛПС

№№ п/п	Группы	Уреазы, мк-кат/кг	Лизоцим, ед/кг	Степень дисбиоза, ед.
1	Норма	0,020 ± 0,007	139 ± 9	1,0 ± 0,1
2	ИД (7 сут.)	0,163 ± 0,017 $p < 0,001$	94 ± 10 $p < 0,01$	12,0 ± 0,3 $p < 0,001$
3	Дисбиоз (14 сут.)	0,196 ± 0,024 $p < 0,001$	64 ± 7 $p < 0,001$	21,3 ± 0,6 $p < 0,001$
4	ЛПС (8 сут.)	0,120 ± 0,015 $p < 0,001$	58 ± 6 $p < 0,001$	15,5 ± 0,5 $p < 0,001$

Примечание. p – показатель достоверности различий с группой «Норма».

Таблица 3

Содержание гиалуроновой кислоты в коже крыс с ИД, дисбиозом и действии ЛПС

№№ п/п	Группы	Гиалуроновая кислота, мг/кг
1	Норма	302 ± 34
2	ИД (7 сут.)	211 ± 23 $p < 0,05$
3	Дисбиоз (14 сут.)	174 ± 21 $p < 0,01$
4	ЛПС (8 сут.)	198 ± 24 $p < 0,01$

Примечание. p – показатель достоверности различий с группой «Норма».

Таблица 4

активация гиалуронидазы, фермента, расщепляющего гиалуроновую кислоту, что, в конечном итоге, значительно увеличивает проницаемость ткани для лейкоцитов, микробов и их токсинов. Конечный результат этого процесса – воспалительно-дистрофический процесс [5].

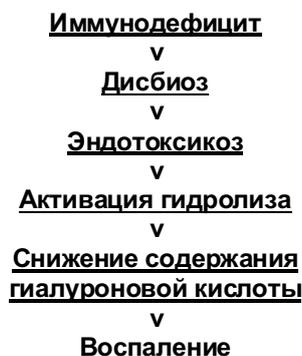


Схема патогенеза дерматитов при иммунодефиците

Принимая такую схему патогенеза становится понятной целесообразность использования антидисбиотических препаратов (про- и пребиотиков) для профилактики и лечения кожных осложнений у больных с синдромом ИД [18-20].

Литература

1. Шухтин В.В. Дисбиотические аспекты патогенеза поражений кожи у крыс с иммунодефицитом / В.В. Шухтин, А.И. Гоженко, А.П. Левицкий //
2. Лебедев К.А. Иммунная недостаточность (выявление и лечение) / К.А. Лебедев, И.Д. Понякина – М.: Медицина, 2003. – 443 с.
3. Алешина Р.М. Синдром возможной иммунной недостаточности: клинико-лабораторная характеристика / Р.М. Алешина // Кліні. імунологія. Алергологія. Інфектологія. – 2007. – № 2 (7). – С. 17-20.
4. Яковлев М.Ю. Элементы эндотоксиновой теории физиологии и патологии человека / М.Ю. Яковлев // Физиология человека. – 2003. – т. 29, № 4. – С. 98-109.
5. Яковлев М.Ю. «Эндотоксиновая агрессия» как предболезнь или универсальный фактор патогенеза заболеваний человека и животных / М.Ю. Яковлев / Успехи соврем. биологии. – 2003. – т. 123, № 1. – С. 31-40.
6. Пат. 31012 Україна, МПК (2009) А61Р 31/00. Спосіб моделювання дисбіозу (дисбактеріозу) / Левицький А.П., Селіванська І.О., Цисельський Ю.В. [та ін.]. – опубл. 25.03.08, Бюл. № 6.
7. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe – 18.03.1986. – Strasbourg, 1986. – 52 p.
8. Биохимические маркеры воспаления тканей ротовой полости: метод. рекомендации / А.П. Левицкий, О.В. Деньга, О.А. Макаренко [и др.] – Одесса, 2010. – 16 с.
9. Левицкий А.П. Методы определения активности эластазы и ее ингибиторов: метод. рекомендации / А.П. Левицкий, А.В. Стефанов – К.: ГФЦ, 2002. – 15 с.
10. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии. - М. : Медицина, 1977. - С. 66–68.
11. Гирин С. В. Модификация метода определения активности каталазы в биологических субстратах / С. В. Гирин // Лабораторная диагностика. - 1999. - № 4. - С. 45–46.
12. Ферментативный метод определения дисбиоза полости рта для скрининга про- и пребиотиков: метод. рекомендации / А.П. Левицкий, О.А. Макаренко, И.А. Селиванская [и др.] – К.: ГФЦ МЗУ, 2007. – 22 с.
13. Пат. 43140 Україна, МПК (2009) G01N 33/48. Спосіб оцінки ступеня дисбіозу (дисбактеріозу) органів і тканин / Левицький А.П., Деньга О.В., Селіванська І.О. [та ін.]. – № u200815092. – заявл. 26.12.08; опубл. 10.08.09, Бюл. № 15.
14. Асатиани В.С. Новые методы биохимической фотометрии / В.С. Асатиани –

М.: Наука, 1965. – 298 с.

15. Противовоспалительная активность гиалуроновой кислоты / М.Т. Азиабаев, А.Р. Имаева, С.А. Башкатов [и др.] // Эксп. и клин. фармакология. – 2003. – т. 66, № 5. – С. 28-29.
16. Спектрометрическое исследование состава микроорганизмов кишечника у больных себорейным дерматитом / И.В. Полеско, Ю.С. Бутов, Г.А. Осипов [и др.] // Рос. ж. кож. и венерол. болезней. – 2006. – № 3. – С. 23-27.
17. Роль эндотоксинемии в формировании десквалятивных поражений кожи / И. В. Полеско, Ю.С. Бутов, В.В. Малиневская [и др.] // Рос. ж. кож. и венерол. болезней. – 2009. – № 3. – С. 38-41.
18. Применение гастроинтестинальных препаратов в комплексной терапии атопического дерматита / И.В. Хамаганова, Г.Д. Никифорова, А.Г. Шекрота [и др.] / Рус. мед. ж. – 2004-12. – № 14. – С. 828-829.
19. Усенко Д.В. Использование пробиотического продукта, содержащего *Lactobacillus casei* Defensis, в лечении кишечных инфекций у детей с измененной аллергической реактивностью / Д.В. Усенко, А.В. Горелов, С.В. Шаблина // Инфекционные болезни. – 2005. – т. 3, № 3. – С. 51-54.
20. Можливість використання пробіотиків для відновлення еубіозу шкіри / О.В. Покришко, С.І. Климнюк, Г.М. Кременчуцький [та ін.] // Здобутки клін. та експер. медицини. – 2006. – № 2. – С. 89-95.

Резюме

БИОХИМИЧНИ МАРКЕРИ ЗАПАЛЕННЯ І ДИСБІОЗА У ШКІРІ ЩУРІВ З ІМУНОДЕФІЦИТОМ, КИШКОВИМ ДИСБІОЗОМ І ДІЄЮ ЛІПОПОЛІСАХАРИДА

Шухтин В.В., Гоженко А.И.,
Левицкий А.П. Шухтина И.Н.

Досліджували в шкірі щурів стан запалення (по рівню еластази і малонowego діальдегіду), ступінь дисбіоза (за

співвідношенням відносних активностей уреазы і лізоциму), рівень антиоксидантного захисту (за активністю каталази і антиоксидантно-прооксидантного індекса АПІ), а також вміст гіалуронової кислоти. Моделювали імунодефіцит (ІД) за допомогою циклофосфана, кишковий дисбіоз – за допомогою лінкоміцину і ендотоксикоз – за допомогою ліпополісахариду (ЛПС).

Встановлено, що при усіх трьох діях спостерігається розвиток в шкірі дисбіоза і запалення, обумовлене, мабуть, зниженням вмісту гіалуронової кислоти і послабленням антиоксидантного захисту.

Ключові слова: шкіра, імунодефіцит, дисбіоз, ліпополісахарид, запалення, антиоксидантна система.

Summary

BIOCHEMICAL MARKERS OF INFLAMMATION AND DYSBIOSIS IN THE SKIN OF RATS WITH IMMUNODEFICIENCY, INTESTINAL DYSBIOSIS AND ACTION OF LIPOPOLYSACCHARIDES.

Shukhtin V.V., Gozhenko A.I.,
Levitskiy A.P., Shukhtina I.N.

The degree of coetaneous inflammation has been investigated by the level of elastase and malone dialdehyde, degree of dysbiosis by the ration of relative activity of urease and lysozyme, level of antioxidative protection by the activity of catalase and antioxidative-prooxidative index and content of hyalurone acid. Immunodeficiency has been moulded by cyclophosphane, intestinal dysbiosis- by lyncomisyne and endotoxicosis – by lipopolysaccharide. It has been established that at all types of influence the development of coetaneous dysbiosis and inflammation takes place. The latter is stimulated, probably, by the decrease of hyalurone acid level and weakening of antioxidative protection.

Key words: skin, immunodeficiency, dysbiosis, lipopolysaccharide, inflammation, antioxidative system

*Впервые поступила в редакцию 16.05.2013 г.
Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования*