

Я. О. Бутко¹, С. М. Дроговоз¹, А. М. Ляпунова², Л. О. Булига¹

Дослідження впливу глюкокортикостероїдів і керамідів на імунобіохімічні маркери запалення за алергічного дерматиту

¹Національний фармацевтичний університет, м. Харків²Державний науково-дослідний центр лікарських засобів, м. Харків

Ключові слова: алергічний дерматит, цитокіни, глюкокортикостероїди

Важливою проблемою сучасної медицини є збільшення частоти алергічно-запальних уражень шкіри. За даними МОЗ України алергічні контактні дерматити (АКД) складають 70 % від усіх дерматологічних захворювань [6]. АКД часто має рецидивуючий перебіг з поширеним ураженням шкіри й розвитком ускладнень, що призводить до тривалої непрацездатності пацієнтів, погіршення якості їхнього життя, соціальної активності та становить не тільки медичну, але й важливу соціальну проблему [1, 6, 11].

Запальна реакція ініціюється внаслідок активації ключових прозапальних цитокінів – інтерлейкіну-1 (ІЛ-1) і фактора некрозу пухлини (ФНП- α), що мають широкий спектр біологічних властивостей (викликають хемотаксис і проліферацію нейтрофілів, лімфоцитів і еозинофілів, дендритних клітин і ін., сприяють проникненню лімфоцитів у вогнище ураження) і викликають ланцюг клітинних взаємодій, що призводять до формування запального клітинного інфільтрату [5, 7, 9]. У свою чергу, клітини запального інфільтрату є продуцентами цих цитокінів, що зумовлює підтримку локальної запальної реакції, регуляція і результат якої залежить від рівноваги між продукцією та інгібіцією синтезу цитокінів [7, 9].

ІЛ-1 α і ФНП- α індукують запальний процес завдяки участі структур як уродженого імунітету (їхня продукція здійснюється активованими клітинами шкіри, макрофагами, моноцитами, нейтрофілами), так і набутого імунітету (забезпечують процес презентації анти-

гена в регіональних лімфатичних вузлах, формування клону антигенспецифічних Т-лімфоцитів і міграцію їх у вогнище запалення). Характер дії цитокінів залежить від їхнього вмісту: низькі концентрації регулюють розвиток місцевої запальної реакції, у той час, як високі концентрації викликають розвиток системної запальної реакції, що супроводжується лихоманкою, лейкоцитозом, підвищенням рівня білків гострої фази (С-реактивного білка (СРБ), гаптоглобіну, ферритину та ін.) [4, 5, 7]. Тому важливими маркерами при діагностиці запальних захворювань є зміни імунобіохімічних показників (ФНП- α , ІЛ-1 α та СРБ). Крім того, висока чутливість методик їхнього визначення дозволяє охарактеризувати ефективність лікування запальних захворювань [5].

Розвитку АКД сприяє також порушення бар'єрної функції шкіри. Зокрема, дисбаланс позаклітинних ліпідів рогового шару епідермісу призводить до збільшення втрати води та сухості шкірного покриву, підвищення його проникності для алергенів [9, 11, 12]. Зменшення кількості ліпідів (у тому числі керамідів) у роговому шарі призводить до зниження еластичності корнеоцитів та збільшення міжклітинних проміжків, що призводить до розвитку запалення, як наслідок, кератиноцити розпочинають секретувати цитокіни, що поглиблюють запальні процеси в шкірі [10–12].

Таким чином, враховуючи мультифакторність розвитку запальних захворювань шкіри, лікування має бути спрямованим на ліквідацію запального процесу в шкірі та відновлення шкірного бар'єра (захисної функції, еластичності, вологості).

У цьому відношенні перспективним напрямом є удосконалення існуючих місцевих протизапальних препаратів шляхом створення комбінованих препаратів на основі глюкокортикостероїдів (ГКС) з вологоутримуючими речовинами, зокрема, з керамідами, що беруть участь у клітинній проліферації, відновлюють цілісність шкірного покриву, підвищують стійкість шкіри до алергенів і токсинів [12]. З цієї метою було розроблено препарати «Мометазон з керамідами» у вигляді крему та «Метилпреднізолон з керамідами» у вигляді мазі.

Мета дослідження – вивчення рівня цитокінів ІЛ-1 і ФНП- α з одночасним визначенням білка гострої фази запалення (СРБ) у крові щурів за алергічного дерматиту та лікування місцевими препаратами, що містять вищевказані ГКС і кераміди.

Матеріали та методи. Об'єктами дослідження були лабораторні зразки крему «Мометазон з керамідами» (містить 0,1 % мометазона фуроат, 0,5 % керамідів) та мазі «Метилпреднізолон з керамідами» (містить 0,1 % метилпреднізолону ацепонат, 0,5 % керамідів), що розроблені професором М. О. Ляпуновим. Препаратами порівняння було обрано крем «Елоком» (містить 0,1 % мометазона фуроат, виробник «Шеринг Плау», Бельгія) та мазь «Адвантан» (містить 0,1 % метилпреднізолону ацепонат, виробник «Шеринг АГ», Німеччина).

В експерименті використано 42 щури-самки масою 220–250 г, яких було розподілено на 7 груп: перша група – інтактні тварини; друга – тварини, яких виводили з досліду через добу після сенсibilізації (на 3 день досліду, який вважали піком патології); третя – тварини, яких не лікували (контрольна патологія); четверта – тварини, яких лікували кремом «Мометазон з керамідами», п'ята – кремом «Елоком», шоста – маззю «Метилпреднізолон з керамідами», сьома – маззю «Адвантан». Для розвитку АКД тварин сенсibilізували 5 % спиртовим розчином 2,4-динітрохлорбензолу (ДНХБ) за методом П. М. Залкан [2]. Лікування тварин розпочинали на наступний день

після сенсibilізації. Місцеві препарати наносили протягом 7 днів на уражену ділянку шкіри ($3 \times 3 \text{ см}^2$) 1 раз на добу в дозах 15 мг/см² (креми) та 20 мг/см² (мазі). Для оцінки виразності системних проявів алергічного процесу та ефективності його лікування проводили імунобіохімічний аналіз у сироватці крові тварин наступних показників: ІЛ-1 α , ФНО- α та СРБ. Ці показники визначали на піку патології (3 день досліду) та на 7 день лікування (10 день досліду).

Для кількісного визначення прозапальних цитокінів ІЛ-1 α і ФНП- α (тест-система фірми «Bender Medsystems», США), а також СРБ (тест-система фірми «Укрмедсервіс», Україна) використовували метод імуноферментного аналізу та аналізатор «Libline-90» (Австрія).

Усі втручання та евтаназію тварин здійснювали з дотриманням принципів «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і наукових цілей» (Страсбург, 1986) та I Національного конгресу з біоетики (Київ, 2001 р.).

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою тесту Т'юкі з використанням середнього значення, стандартного відхилення, похибки середнього, відмінності між групами порівняння вважали достовірними при $p < 0,05$ [8].

Результати та їх обговорення. У ході досліду після повторної сенсibilізації у тварин спостерігали розвиток АКД (гіперемію, дифузний набряк, еритему на шкірі). Результати вивчення імунобіохімічних показників показали, що розвиток АКД (пік патології) супроводжувався достовірним підвищенням у крові щурів ФНП- α , ІЛ-1 α та СРБ у 11,4; 26,6 та 50,2 разу відповідно до показників інтактних тварин, що свідчить про інтенсивне протікання запального процесу в тварин з дерматитом (таблиця).

На 7 день спостережень (10 день досліду) у групі контрольної патології рівень ФНП- α , ІЛ-1 α та СРБ був достовірно вищим у 7,7; 22,8 та 33,1 разу відповідно до показників інтактних тварин. Ці результати свідчать про масивну

**Уміст прозапальних цитокінів та С-реактивного білка в крові щурів
за умов алергічного дерматиту та застосування досліджувальних
препаратів ($M \pm m, n = 6$)**

№	Група дослідю	Дні дослідю	Показник		
			ФНП- α , пг/мл	ІЛ-1 α , нг/мл	СРБ, мг/л
1	Інтактний контроль	3	25,53 \pm 2,58	3,25 \pm 0,47	0,58 \pm 0,24
2	Пік патології	3	291,62 \pm 6,77*	86,39 \pm 2,91*	29,12 \pm 1,96*
3	Контрольна патологія	10	197,43 \pm 14,57*/#	74,06 \pm 4,69*	19,22 \pm 0,78*/#
4	Крем «Мометазон з керамідами»	10	84,30 \pm 3,39*/#/\$	38,71 \pm 2,80*/#/\$	2,09 \pm 0,30*/#/\$
5	Крем «Елоком»	10	90,17 \pm 3,56*/#/\$	43,91 \pm 2,60*/#/\$	3,51 \pm 0,38*/#/\$
6	Мазь «Метилпреднізолон з керамідами»	10	76,97 \pm 3,53*/#/\$	30,98 \pm 3,34*/#/\$	1,15 \pm 0,19*/#/\$
7	Мазь «Адвантан»	10	71,99 \pm 4,80*/#/\$	28,20 \pm 2,66*/#/\$	0,86 \pm 0,10*/#/\$

Примітка. *Відмінності достовірні відносно показника групи інтактних тварин ($p < 0,05$, тест Т'юкі); #відносно піка патології ($p < 0,05$); \$відносно контрольної патології ($p < 0,05$); n – кількість тварин у групі.

деструкцію клітин і виражену запальну реакцію при розвитку АКД [7].

Після лікування тварин кремом «Мометазон з керамідами» спостерігали достовірне зниження рівня ФНП- α , ІЛ-1 α та СРБ у 2,3; 1,9 і 9,2 разу, кремом «Елоком» – у 2,2; 1,7 та 5,5 разу, маззю «Метилпреднізолон з керамідами» – у 2,6; 2,4 та 16,7 разу, маззю «Адвантан» – у 2,7; 2,6 та 22,3 разу відповідно порівняно з контрольною патологією. Ці зміни свідчать про зниження деструкції клітин, запального процесу та активізацію проліферативних процесів у шкірі. Також слід зазначити, що при використанні досліджуваних препаратів значення ФНП- α та ІЛ-1 α достовірно не відрізнялися від значень препаратів порівняння, але рівня показників інтактних тварин вони не досягли. Під дією місцевих препаратів спостерігали нормалізацію показника білка гострої фази запалення до рівня інтактних показників, але вплив препаратів на рівень СРБ був дещо неоднозначним. Так, дія крему «Мометазон з керамідами» мала тенденцію до перевищення в 1,7 разу дії крему «Елоком», а при застосуванні мазі «Метилпреднізолон з керамідами» лікувальна дія

дещо (недостовірно) поступалася в 1,3 разу мазі «Адвантан».

Таким чином, розвиток алергічного дерматиту в щурів супроводжувався підвищенням рівня прозапальних цитокінів (ФНП- α , ІЛ-1 α) та білка гострої фази запалення. У нелікованих тварин рівень досліджуваних показників залишався високим до кінця дослідю порівняно з показниками інтактних тварин, що свідчить про важкий перебіг алергічного дерматиту. У ході лікування тварин препаратами з ГКС та керамідами спостерігали достовірне зниження імунобіохімічних маркерів запалення як у порівнянні з піком патології (3 доба), так і з контрольною патологією (10 доба), що підтверджує виражену протизапальну дію крему «Мометазон з керамідами» і мазі «Метилпреднізолон з керамідами». Уведення керамідів до складу місцевих препаратів з глюкокортикостероїдами не спричинило зменшення протизапальної дії останніх, що свідчить про відсутність антагонізму між ними. Однак кераміди сприяють загоєнню та відновленню нормальної структури пошкодженої шкіри, що було підтверджено гістологічними дослідженнями в наших попередніх дослідях [3].

Висновки

1. Розвиток алергічного контактного дерматиту характеризується вираженим і тривалим підвищенням вмісту маркерних прозапальних цитокінів та білка гострої фази запалення в крові тварин.

2. На моделі ДНХБ дерматиту в щурів місцеві препарати, що містять глюкокортикостероїди та кераміди, проявили протизапальну дію, про що

свідчить зниження рівня прозапальних цитокінів (ІЛ-1 α та ФНП- α) та нормалізація вмісту білка гострої фази запалення – С-реактивного білка.

3. Перспективним є подальше фармакологічне вивчення препаратів з глюкокортикостероїдами та керамідами у вигляді крему та мазі з метою підвищення ефективності лікування алергічного дерматиту.

1. Бунин С. А. Анализ структуры потребления лекарственных средств при лечении аллергических дерматитов / С. А. Бунин, С. З. Умаров, В. А. Моргунов // Вест. Росс. воен.-мед. академии. – 2008. – № 3. – С. 86–89.
2. Бунятян Н. Д. Эффективность 5 % альтановой мази при контактном дерматите у крыс / Н. Д. Бунятян, В. В. Березнякова, Т. Ю. Глазкова // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2004. – № 1. – С. 160–162.
3. Бутко Я. О. Вплив крему «Мометазон з керамідами» на морфоструктуру шкіри при алергічному дерматиті / Я. О. Бутко, Ю. Б. Лар'яновська // Укр. біофарм. ж-л. – 2013. – № 1 (24). – С. 23–27.
4. Вельков В. В. С-белок структура, функция, методы определения / В. В. Вельков // Медицинский дайджест. Медэксперт. – 2008. – № 2. – С. 33–36.
5. Воспаление: этиология, патогенез, патогенетическое обоснование принципов терапии / [Н. П. Чеснокова, Т. А. Невважай, О. Л. Морозова и др.]. – Саратов: Изд-во СГМУ. – 2008. – 120 с.
6. Волкославська В. М. Стан захворюваності на дерматози в Україні через 20 років після аварії на ЧАЕС / В. М. Волкославська, О. Л. Гутнев // Укр. журн. дерматол., венерол., косметол.: наук.-практ. видання. – 2010. – № 3. – С. 153.
7. Провоспалительные цитокины ИЛ-1 и ФНО- α в очагах поражения кожи больных псориазом / О. Р. Катунина, А. В. Резайкина, О. Р. Катунина [и др.]. // Vestn. Dermatol. Venerol. – 2011. – № 4. – С. 25–30.
8. Халафян А. А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных / А. А. Халафян: Учебник. – [3-е изд.]. – М.: ООО «Бином-Пресс», 2007. – 512 с.
9. Cellular and molecular mechanisms in atopic dermatitis / M. K. Oyoshi, R. He, L. Kumar, J. Yoon [et al.] // Adv. Immunol. – 2009. – V. 102, № 1. – P. 135–226.
10. Ceramides and barrier function in healthy skin / J. Mutanu Jungersted, L. I. Hellgren, J. K. Høgh [et al.] // Acta Derm Venereol. – 2010. – V. 4, № 90. – P. 350–353.
11. Pacha O. Treating atopic dermatitis: safety, efficacy and patient acceptability of a ceramide hyaluronic acid emollient foam / O. Pacha, A. A. Hebert // Clin Cosmet Investig Dermatol. – 2012. – № 5. – P. 31–37.
12. Sajić D. A look at epidermal barrier function in atopic dermatitis: physiologic lipid replacement and the role of ceramides / D. Sajić, R. Asiniwasis, S. Skotnicki-Grant // SkinTherapyLett. – 2012. – V.7, № 17. – P. 6–9.

Я. О. Бутко, С. М. Дрогвоз, А. М. Ляпунова, Л. О. Булига

Дослідження впливу глюкокортикостероїдів та керамідів на імунобіохімічні маркери запалення при алергічному дерматиті

На моделі динітрохлорбензолового дерматиту встановлено, що розвиток алергічного дерматиту в щурів супроводжувався підвищенням рівня прозапальних цитокінів (ФНП- α , ІЛ-1 α) та білка гострої фази запалення (СРБ). У ході лікування тварин препаратами, що містять ГКС та кераміди, спостерігали достовірне зниження імунобіохімічних маркерів запалення як порівняно з піком патології (3 доба), так і з контрольною патологією (10 доба), що підтверджує виражену протизапальну дію крему «Мометазон з керамідами» та мазі «Метилпреднізолон з керамідами». Таким чином, перспективним є подальше фармакологічне вивчення препаратів з ГКС та керамідами у вигляді крему та мазі з метою підвищення ефективності лікування алергічного дерматиту.

Ключові слова: алергічний дерматит, цитокіни, глюкокортикостероїди

Я. А. Бутко, С. М. Дрогвоз, А. Н. Ляпунова, Л. А. Булыга

Исследование влияния глюкокортикостероидов и керамидов на иммунобиохимические маркеры воспаления при аллергическом дерматите

На модели динитрохлорбензолового дерматита установлено, что развитие аллергического дерматита у крыс сопровождалось повышением уровня провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 α)

и белка острой фазы воспаления (СРБ). В ходе лечения животных препаратами, содержащими ГКС и керамиды, наблюдали достоверное снижение иммунобиохимических маркеров воспаления как в сравнении с пиком патологии (3 сутки), так и с контрольной патологией (10 сутки), что подтверждает выраженное противовоспалительное действие крема «Мометазон с керамидами» и мази «Метилпреднизолон с керамидами». Таким образом, перспективным является дальнейшее фармакологическое изучение препаратов с ГКС и керамидами в виде крема и мази с целью повышения эффективности лечения аллергического дерматита.

Ключевые слова: аллергический дерматит, цитокины, глюкокортикостероиды

Y. O. Butko, S. M. Drogovoz, A. N. Lyapunova, L. O. Bulyga

The study of glucocorticosteroids and ceramides influence on immunobiochemical markers of inflammation in allergic dermatitis

Spreading of inflammatory diseases of the skin makes the problem of creating the most efficient and safe local drugs for treatment of dermatitis more actual. Due to the fact that patients with chronic dermatitis have a disturbed barrier function of the skin, it is necessary add substances in local drugs that would normalize the hydrophilic-lipophilic balance of the skin and also restore the matrix structure of the epidermis, improve metabolism of epithelial cells (emollients, ceramides et al.). Therefore, in order more effective local action in the treatment of dermatitis, led by Professor N.A. Lyapunov, local drugs with glucocorticosteroids, which contains ceramides were developed. The aim of the research was to study the influence of local drugs with glucocorticosteroids and ceramides on the immunobiochemical processes in the development of allergic contact dermatitis. On the model of dinitrochlorobenzene-induced dermatitis it has been established that allergic dermatitis development in rats is associated with increase of anti-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 α) and acute phase protein (CRP) levels. Levels of investigative parameters in untreated animals remained high until the end of experiment, compared to intact levels, indicating severe course of allergic dermatitis. While treating animals with preparations containing glucocorticosteroids and ceramides we observed significant reduction in immunobiochemical markers of inflammation comparing both to the peak of pathology and control pathology, confirming pronounced anti-inflammatory action of cream «Mometasone with ceramides» and ointment «Methylprednisolone with ceramides». It should be mentioned that adding ceramides to the formula of local preparations containing glucocorticoids did not result in anti-inflammatory action reduction of the latter, indicating absence of antagonism between them. Therefore, further pharmacological study of preparations in the form of cream and ointment containing glucocorticosteroids and ceramides is prospective in order to improve effectiveness of allergic dermatitis treatment.

Key words: allergic dermatitis, cytokines, glucocorticosteroids

Надійшла: 13.02.2014 р.

Контактна особа: Бутко Ярослава Олександрівна, доцент, кандидат фарм. наук, кафедра фармакології, Національний фармацевтичний університет, буд. 12, вул. Мельнікова, м. Харків, 61002. Тел.: +38 057 706 30 69. Електронна пошта: yaroslavabutko79@mail.ru