Summary

THE ROLE OF PROTEOLYSIS PROCESSES AND ANTYPROTEASE POTENTIAL IN THE BRONCHIAL TUBES IN EXPERIMENTAL ASTHMA AND THEIR CORRECTION OF THIOTRIAZOLIN

Kolishetska M.A.

In experiments on guinea pigs showed that asthma is accompanied by a significant imbalance proteinase-inhibitory system (an increase of proteolytic activity against the backdrop of proteolysis inhibitor deficiency). Intensity of proteolysis, namely azoalbuminu, azokazeyinu and azokolahenu levels, grow in direct proportion to the degree of lesion and reach a maximum in the later period of the experiment (33 rd day asthma). Parallel to fix lower activity inhibitor of proteolysis - б1- proteinase inhibitor and б2-macroglobulin.

Analysis of the impact of the proposed correction to proteolytic activity in the bronchi indicates that thiotriazolin showing corrective action and helps to restore the balance of proteinase-inhibitory system in experimental asthma.

Key words: *asthma, azoalbumin, azokasein, azokolagen, б1-protease inhibitor, б2-macroglobulin, thiotriazolin.*

Впервые поступила в редакцию 20.04.2017 г.
Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования

УДК 616.5–001.17–001.22–092.9:546.172.6:57.088.6

ВЛИЯНИЕ ЛОКАЛЬНОГО УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА МЕТАБОЛИТЫ ОКСИДА АЗОТА И МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ КОЖИ МОРСКИХ СВИНОК

Миронченко С.И., Звягинцева Т.В., Наумова О.В.
Национальный фармацевтический университет
Харьковский национальный медицинский университет
s.mironchenko@ukr.net

Целью работы явилось установление влияния ультрафиолетового облучения (УФО) на систему оксида азота (NO) и морфофункциональное состояние кожи морских свинок. Исследования проведены на 24 морских свинках-альбиносах массой 400-500 г, подвергшихся локальному УФО. Группой контроля служили интактные морские свинки (n = 6). Через 2 часа, 4 часа, на 3-и и 8-е сутки после облучения в коже определяли содержание метаболитов NO (суммарных метаболитов, нитрит-аниона, нитратов) и проводили гистологические исследования. Установлено, что развитие УФ эритемы (1 МЭД) сопровождается накоплением всех метаболитов NO, воспалительно-дегенеративными изменениями, появлением sunburn cells в коже, достигавшими наибольшей степени выраженности на 3-и сутки после облучения. В постэритемный период (8-е сутки) в коже продолжается патологический процесс, подтверждающийся микроскопически (сохраняются пролиферативно-гиперпластические и дегенеративные изменения) и сопровождающийся повышением всех метаболитов NO.

Ключевые слова: *оксид азота, морфологические изменения, кожа, ультрафиолетовое облучение*

Введение

Избыточное ультрафиолетовое (УФ) излучение вызывает формирование мощной ответной реакции с вовлечением всех компонентов кожи [1, 2]. Ультрафиолетовое облучение (УФО) индуцирует продукцию оксида азота (NO) – основного медиатора межклеточных взаи-

модействий, в том числе и в иммунной системе [3,4]. Избыточное количество NO приводит к нарушениям иммунологического характера, которые, как известно, играют первостепенную роль в развитии не только ранних, но и отдаленных последствий УФ-излучения: фотостарение, канцерогенез [1]. Поэтому изучение содержания метаболитов NO и морфофункциональных особенностей кожи представляется перспективным в плане уточнения патогенеза и обоснования методов лечения УФ-индуцированных повреждений кожи.

Цель работы: установить состояние системы оксида азота и особенности морфологических изменений кожи морских свинок под влиянием локального УФО.

Материал и методы

Исследования были выполнены на 24 морских свинках-альбиносах массой 400-500 г. Эритему вызывали облучением в 1 минимальной эритемной дозе (1 МЭД) выбритого участка кожи с помощью ртутно-кварцевого облучателя ОКН-11-М (УФ-лучами А и В), помещенного на расстоянии 10 см от животного, в течение 2 минут. При этом участок кожи экранировался круглой пластинкой, имеющей пять отверстий диаметром 6 мм. Степень реакции оценивали через 2, 4 часа, 3 суток после облучениях до момента исчезновения эритемы в баллах для каждого пятна: 0 – отсутствие эритемы, 1 – четкое покраснение, 2 – интенсивная эритема. Суммировали интенсивность 5-и пятен. Уровень повреждающего действия оценивали по интенсивности и длительности эритемной реакции [5]. Группой контроля служили интактные морские свинки (n = 6). В коже через 2 часа, 4 часа, на 3-и и 8-е сутки после облучения определяли содержание суммарных метаболитов NO, нитрит-аниона, нитратов спектрофотометрическим методом [6]. Для исследования особенностей морфологических изменений кожи после локального УФО животных декапитировали под общим наркозом (тиопентал-натрий в дозе 60 мгD кг) на разных сроках эксперимента (2 часа, 4 часа, 3-и сутки, 8-е сутки). Кусочки кожи фиксировали в 10% нейтральном формалине, после чего иссекались кусочки толщиной около 4 мм. Материал подвергали спиртовой проводке и парафиновой заливке, изготавливали срезы толщиной 5-6 мкм. Обзорные препараты, окрашенные гематоксилином и эозином, использовались для общей оценки состояния исследуемых тканей. Окрашивание препаратов фукселином на эластические волокна по Вейгерту с докрашиванием пикрофусином по ван Гизон использовалось для выявления и дифференцировки соединительнотканных структур [7,8]. Полученные данные обрабатывались статистически методом вариационной статистики [9].

Результаты и их обсуждение

У всех морских свинок после локального УФО развивалась эритема. Через 2 часа после облучения суммарная эритема составляла 4,8 балла. Через 4 часа после облучения регистрировался максимум, когда суммарная интенсивность 5-и пятен возрастала до 9,2 балла. На 3-и сутки интенсивность суммарной эритемы была выраженной, составляя 7,7 баллов, но затем постепенно уменьшалась и исчезала на 8-е сутки.

На протяжении всего эксперимента определяется повышение содержания суммарных метаболитов NO в коже. Так, через 2 часа после облучения наблюдается их увеличение в 1,7 раза, через 4 часа после облучения – в 1,8 раза по сравнению с интактными животными. Максимальное увеличение концентрации суммарных метаболитов NO отмечается на 3-и сутки после облучения: в 2,3 раза относительно интактных морских свинок и в 1,3 раза по сравнению с предыдущими сроками. В дальнейшем наблюдается их снижение, однако на 8-е сутки данный показатель остается выше нормы в 1,9 раза.

Выявлено увеличение продукции

нитрит-аниона в коже животных на протяжении всего периода исследования. Так, содержание данного метаболита в коже повышается в 1,5 раза (через 2 и 4 часа после облучения) и 2,1 раза (на 3-и сутки) относительно интактной группы. По мере снижения интенсивности эритемы уровень нитрит-аниона имеет тенденцию к уменьшению, однако на 8-е сутки сохраняется высоким (в 1,8 раза) по сравнению с интактными животными

Уровень нитратов в коже также повышается. Так, через 2 и 4 часа после облучения уровень нитратов увеличивается в 1,7 и 1,8 раза по отношению к интактной группе. В дальнейшем — на 3-и сутки после облучения – уровень данного метаболита еще больше увеличивается (в 2,3 раза) относительно показателей интактных морских свинок. В последующем сроке (на 8-е сутки) отмечается тенденция к снижению содержания нитратов относительно предыдущего срока, однако их уровень остается высоким, превышая норму в 1,9 раза. Полученные данные свидетельствуют о значительном накоплении в коже концентрации всех метаболитов NO в условиях УФ-индуцированного стресса.

При морфологическом исследовании кожи на протяжении 8-и суток выявляются нарушения ее гистоструктуры.

Так, через 2 часа после УФО гистологические изменения в коже минимальны и характеризуются слабо выраженными экссудативными изменениями в виде нерезкого полнокровия сосудов и краевого стояния лейкоцитов в их просвете, а также появлением признаков дермо-эпидермальной активности.

Через 4 часа после УФО нарастают дисциркуляторные изменения, что морфологически проявляется выраженным полнокровием сосудов с набуханием эндотелия и отёком дермы, межклеточным отёком эпидермиса с утратой межклеточных контактов с вакуолизацией ткани в области дермо-эпидермального соединения, появлением лейкоцитарной инфильтрации дермы. В структурных компонентах кожи отмечаются альтеративные изменения, что морфологически проявляется вакуольной дегенерацией и появлением апоптозно изменённых эпидермоцитов (sunburn cells) как результат УФ повреждения нуклеарной ДНК [1, 2], исчезновением эпидермальных макрофагов, нерезко выраженными изменениями коллагеновых и эластических волокон дермы (набухшие с участками утолщения и фрагментации).

На 3-и сутки эксперимента установлены значительные гистологические изменения. Отмечается утолщение эпидермиса за счет увеличения рядов клеток шиповатого слоя до 2-3. Эпидермоциты шиповатого слоя преимущественной с признаками вакуольной дегенерации, среди них во всех наблюдениях встречаются многочисленные sunburn cells – с пикнотичным ядром и эозинофильной цитоплазмой. Последние располагаются поодиночке, а в 2-х наблюдениях формируют группы из 3-4 экземпляров. Базальные кератиноциты расположены плотно друг к другу, ядра их интенсивно базофильные, ориентированы преимущественно вертикально. Встречаются многочисленные митозы. Роговой слой утолщен, с участками, содержащими сохранившиеся клетки с ядрами (паракератоз). В половине наблюдений очагово в эпидермисе встречаются мелкие скопления лейкоцитов. Отмечаются признаки дермо-эпидермальной активности с формированием участков вакуолизации, а в 3-х наблюдениях со слабо выраженными дезинтегративными изменениями дермо-эпидермального соединения. Сохраняется отёчность дермы, за счёт чего формирующие её коллагеновые и эластические волокна выглядят разобщёнными. Коллагеновые волокна набухшие, неравномерно фуксинофильные, эластические волокна - утолщены, с участками фрагментации. Дерма инфильтрирована полиморфноядерными лейкоцитами, плотность которой варьировала от слабо до умеренно выраженной. Перивас-

кулярно, вокруг придатков кожи несколько чаще в сравнении с предыдущим сроком обнаруживаются инфильтраты из лимфоцитов, макрофагов, немногочисленных тканевых базофилов и нейтрофилов.

К 8-м суткам эксперимента (на момент исчезновения эритемы) наблюдается смена экссудативной фазы воспаления на пролиферативную. Микроскопически в препаратах кожи исследуемых животных отмечается утолщение эпидермального пласта за счёт шиповатого, зернистого и рогового слоёв. Усиление пролиферативной активности базальных кератиноцитов обусловливает развитие гиперпластических процессов в эпидермисе, сочетающихся с дистрофическими изменениями эпидермоцитов и дискератозом. Параллельно отмечается снижение выраженности лейкоцитарной и нарастание лимфомакрофагальной инфильтрации дермы. Выраженность отёка дермы по сравнению с предыдущим сроком снижается, соединительнотканные волокна расположены более компактно. Вследствие усиления пролиферативной и синтетической активности фибробластов нарастает коллагенизация дермы, изменяется содержание и структура эластических волокон. Неравномерно фуксинофильные коллагеновые и эластические волокна утолщены, последние очагово фрагментированы.

Следовательно, даже однократное ультрафиолетовое облучение (1 МЭД) кожи морских свинок вызывает интенсификацию синтеза NO, что подтверждается увеличением всех его метаболитов в коже. Развитие УФ-эритемы характеризуется воспалительно-дегенеративными процессами в коже, что проявляется морфофункциональным изменением дермо-эпидермального соединения, инфильтрацией лейкоцитами в эпидермисе и дерме, деструкцией коллагеновых и эластических волокон, появлением апоптических кератиноцитов (sunburn cells). В постэритемный период, у облученных животных продолжается патологический процесс, сопровождающийся повышением содержания всех метаболитов NO в коже и подтверждающийся микроскопически. Это может приводить к серьезным иммунным нарушениям и развитию отдаленных негативных эффектов.

Выводы

1. Развитие УФ эритемы (1 МЭД) у морских свинок характеризуется накоплением метаболитов NO и воспалительно-дегенеративными изменениями в коже, достигавшими наибольшей степени выраженности на 3-и сутки после облучения:

- умеренное повышение содержания метаболитов NO в коже (через 2 и 4 часа после облучения) сопровождается дисциркуляторными изменениями, сочетающимися с вакуолизацией в области дермо-эпидермального соединения. Через 4 часа после УФО гистологические изменения возрастают, что сопровождается лейкоцитарной инфильтрацией дермы, незначительными изменениями коллагеновых и эластических волокон дермы. Появляются апоптозно изменённые кератиноциты (sunburn cells).
- на 3-и сутки эксперимента при максимальном повышении метаболитов NO в коже гистопатологические изменения в ней достигают максимальной выраженности: в коже присутствуют многочисленные sunburn cells, наблюдаются признаки дермоэпидермальной активности, выраженная инфильтрация дермы лейкоцитами, деструкция коллагеновых и эластических волокон.

2. В постэритемный период (8-е сутки) в коже продолжается патологический процесс, подтверждающийся микроскопически (сохраняются пролиферативно-гиперпластические и дегенеративные изменения, в том числе дистрофического характера) и сопровождающийся накоплением всех метаболитов NO.

Дальнейшие исследования будут

посвящены установлению взаимосвязей нитроксидергических процессов с морфофункциональным состоянием кожи морских свинок, подвергшихся локальному УФО, а также обоснованию применения препаратов, влияющих на синтез NO.

Литература

1. Janovska J., Voicehovska J., Kasparane L. Sun induced skin damage and immunesuppression // Romania journal of clinical and experimental dermatology. – 2015. –May. –P. 84–90.
2. Bosch R., Philips N., Suarez-Perez J.A et al. Mechanisms of photoaging and cutaneous photocarcinogenesis, and photoprotective strategies with Phytochemicals // Antioxidants. - 2015. - № 4. - P. 248-268.
3. Мironченко С.И. Метаболиты оксида азота при ультрафиолет-индуцированных повреждениях кожи морских свинок / С.И. Мironченко, Т.В. Звягинцева. // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2014- Т. 14. – № 3 (47). – С. 231-234
4. Opldnder C. The Role of Photolabile Dermal Nitric Oxide Derivates in Ultraviolet Radiation (UVR)-Induced Cell Death / C. Opldnder, C. V. Suschek // International Journal of Molecular Sciences. – 2013. – № 14. – P. 191-204.
5. Стефанов А. В. Биоскрининг. Лекарственные средства. К.: Авиценна; 1998: 189.
6. Метельская В. А. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота / В. А. Метельская, Н. Г. Гуманова // Клин. лаб. диагностика. – 2005. – № 6. – С 15–18.
7. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Р. Лилли. – М. : Мир, 1960. – 648 с.
8. Пирс Э. Гистохимия (теоретическая и прикладная) / Э. Пирс. – М. : Иностранная литература, 1962. – 962 с.
9. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М. : Практика, 1998. – 459 с.

References

1. Janovska J., Voicehovska J., Kasparane L. 2015, «Sun induced skin damage and immunesuppression», Romania journal of clinical and experimental dermatology, May, pp. 84–90.
2. Bosch R., Philips N., Suarez-Perez J.A et al. 2015, «Mechanisms of photoaging and cutaneous photocarcinogenesis, and photoprotective strategies with Phytochemicals», Antioxidants, No 4, pp. 248-268.
3. Mironchenko S.I., Zvyagintseva T.V. 2014, «Metabolites of nitric oxide in ultraviolet-induced damage to the skin of guinea pigs», Actual problems of modern medicine: Bulletin of the Ukrainian Medical Dental Academy, Vol. 14, No 3 (47), pp. 231-234 (in Russian).
4. Opldnder C., Suschek C. V. 2013, «The Role of Photolabile Dermal Nitric Oxide Derivates in Ultraviolet Radiation (UVR)-Induced Cell Death», International Journal of Molecular Sciences, No 14, pp. 191-204.
5. Stefanov A. V. 1998, «Bioscreening. Drugs», K. : Avitsenna, 189 p. (in Russian).
6. Metelskaya V.A., Gumanova N.G. 2005, «The screening method for determining the level of nitrogen oxide metabolites», Clinical laboratory diagnostics, No 6, pp. 15-18. (in Russian).
7. Lilli R. 1960, «Pathohistological technique and practical histochemistry», M. : World, 648 p. (in Russian).
8. Pirs E. 1962, «Histochemistry (theoretical and applied)», M. : Foreign Literature, 962 p. (in Russian).
9. Glants S. 1998, «Medico-biological statistics», M.: Practice, 459 p. (in Russian).

Резюме

ВПЛИВ ЛОКАЛЬНОГО УЛЬТРАФІОЛЕТОВОГО ОПРОМІНЕННЯ НА МЕТАБОЛІТИ ОКСИДУ АЗОТУ ТА МОРФОЛОГІЧНИЙ СТАН ШКІРИ МОРСЬКИХ СВИНОК

Мironченко С.І., Звягінцева Т.В., Наумова О.В.

Метою роботи було встановлення впливу ультрафіолетового опромінення (УФО) на систему оксиду азоту (NO) і морфофункціональний стан шкіри морських свинок. Дослідження проведені на 24 морських свинках-альбіносах масою 400-500 г, які зазнали локального УФО. Групою контролю служили інтактні морські свинки (n=6). Через 2 години, 4 години, на 3-у і 8-у добу після опромінення в

шкірі визначали вміст метаболітів NO (сумарних метаболітів, нітрит-аніону, нітратів) і проводили гістологічні дослідження. Встановлено, що розвиток УФ еритеми (1 МЕД) супроводжується накопиченням усіх метаболітів NO, запально-дегенеративними змінами, появою sunburn cells в шкірі, що досягали найбільшого ступеня виразності на 3-ю добу після опромінення. У постеритемний період (8-а доба) в шкірі триває патологічний процес, що підтверджується мікроскопічно (зберігаються проліферативно-гіперпластичні і дегенеративні зміни) і супроводжується підвищенням всіх метаболітів NO.

Ключові слова: *оксид азоту, морфологічні зміни, шкіра, ультрафіолетове опромінення*

Summary

THE IMPACT OF LOCAL ULTRAVIOLET EXPOSURE ON NITROGEN OXIDE METABOLITES AND MORPHOLOGICAL STATE OF SKIN IN GUINEA PIGS

Myronchenko S.I., Zvyagintseva T.V., Naumova O.V.

The purpose of the study was to determine the impact of ultraviolet (UV) exposure on nitric oxide (NO) system and morphofunctional state of the skin in guinea pigs. The study involved 24 albino guinea pigs weighing 400-500 g, exposed to local ultraviolet irradiation. The control group included intact guinea pigs (n = 6). The content of NO metabolites (total metabolites, nitrite anion, nitrates) was determined in the skin in 2 hours, 4 hours, on the 3rd and 8th days after the exposure, and histological studies were performed. The study showed that the development of UV erythema (1 MED) was accompanied by the accumulation of all NO metabolites, inflammatory-degenerative changes and sunburn cells in the skin, reaching the greatest severity on the 3rd day after the exposure. Post-erythematous period (on the 8th day) was characterized by the extension of the pathological process in the skin, which was confirmed microscopically (proliferative-hyperplastic and degenerative changes persisted), accompanied by an increase in all NO metabolites.

Keywords: *nitric oxide, morphological changes, skin, ultraviolet irradiation*

Впервые поступила в редакцию 20.04.2017 г.
Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования