

of long and medium chain free fatty acids in serum // J. Clin. Chem. Clin. Biochem. – 2008. – Vol. 20, – № 11. – P. 813-815.

20. The autoinhibitory feedback control of acetylcholine release in human neocortex tissue // Brain Res. – 1992. – Vol. 572, № 1-2. – P. 64-74.

Координаты для связи с авторами: Тиханов Виктор Иванович – канд. мед. наук, доцент кафедры фармакологии АГМА, тел. +7-914-589-99-13, e-mail: tikchanov@yandex.ru.



УДК 542.46+591.477+678.048

Е.А. Малюк, С.С. Целуйко, Н.П. Красавина

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОЖИ КОНЕЧНОСТЕЙ КРЫС ПРИ МЕСТНОМ ОХЛАЖДЕНИИ НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИОКСИДАНТА

*Амурская государственная медицинская академия,
675000, ул. Горького, 95, тел./факс 8-(4162)-31-90-20, г. Благовещенск*

Резюме

Установлено, что в дореактивный период, после местного действия холодового фактора на кожу, границы между клетками нечеткие, ядра клеток базального и шиповатого слоев эпидермиса пикнотизированы, возникает стойкий спазм сосудов в сосочковом слое. В реактивный период, после действия низких температур, на границе между эпидермисом и сосочковым слоем наблюдаются процессы разволокнения, в сосудах дермы сохраняются явления стаза. При местном применении дигидрокверцетина в виде мази, как в дореактивный, так и в реактивный период холодовой травмы, роговые чешуйки приобретают более четкие границы, в сосудах дермы явление стаза незначительные. На основе морфологического, морфометрического и биохимического исследований доказана целесообразность использования препарата дигидрокверцетина при действии низких температур на кожу.

Ключевые слова: эпидермис, дерма, кератиноциты, локальное охлаждение кожи, дигидрокверцетин, перекисное окисление липидов.

E.A. Maliuk, S.S. Tseluyko, N.P. Krasavina

STRUCTURAL CHANGES IN THE LIMBS SKIN IN RATS AT LOCAL COLD EXPOSURE DURING TREATMENT WITH ANTIOXIDANTS

Amur State Medical Academy, Blagoveshchensk

Summary

It was found out that in hypothermia period after topical cold exposure on the skin, boundaries between cells, cell nuclei of the basal layers of the epidermis and were changed. There was a strong spasm of blood vessels in the papillary layer. In reaction period, after the effect of low temperatures on the border between the epidermis and papillary layer, pulping processes are observed, in the blood vessels of the dermis stasis was present. Topical application of dihydroquercetin ointment both in pre-reactive and reactive periods of cold injury, resulted in corneal scales becoming more clearly bordered, in the vessels of the dermis, stasis is mild. Based on morphological, morphometric and biochemical studies we proved the feasibility of dihydroquercetin application at cold exposure to the skin.

Key words: epidermis, dermis, keratinocytes, cold exposure to the skin, dihydroquercetin, lipid peroxidation.

Температура является важнейшим фактором окружающей среды, воздействующей на организм человека и животных. Действие низких температур на биологические объекты зависит от степени филогенетической зрелости организма и реализуется посредством различных механизмов в условиях *in vitro* и *in vivo* [9]. Как правило, в этом случае, имеют место два основных механизма повреждающего действия холода. Первый – это прямое криповреждение, когда низкая температура используется для консервации клеток, клеточных взвесей и тканей. Второе проявля-

ется при действии холодового фактора на организм в целом лишь при температуре окружающей среды ниже ~ 30 °C и при этом, на открытых участках тела могут возникать отморожения, обусловленные повреждающим действием холода непосредственно на ткани [5]. Таким образом, местную холодовую травму следует рассматривать как острую ишемию (полную или неполную) с последующим развитием ранних и поздних постишемических расстройств [2].

Большинство клеток и органов способно противостоять острой ишемической гипоксии в течение 30-

60 минут без необратимых повреждений [13], однако чувствительность различных тканей к ишемии неодинакова.

Известно, что при действии низких температур в соединительной ткани появляются признаки воспалительной реакции. Методами иммуногистохимии можно выявить наличие антигенов в исследуемой ткани животного и человека, способных в чистом виде или в комплексе с белком-носителем вызвать образование антител [3].

Нередко, разрушительные процессы развиваются на фоне восстановления тканевой температуры. Свободные радикалы, накапливающиеся в клетках в виде кислородных синглетов до токсических концентраций, приводят к вторичному повреждению клеточных мембранных структур. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) клеточных мембран является одним из типов нормального метаболического процесса и протекает непрерывно с низкой эффективностью во всех тканях организма [4, 12].

Дигидрокверцетин – основное флаваноидное соединение древесины лиственницы сибирской [14]. Это вещество обладает широким спектром фармакологических эффектов, такими как противовоспалительное, оказывает противоотечное действие, нормализует синтез коллагена в коже, повышает антиоксидантную активность [8, 10]. Согласно мнению ряда авторов, высокий антиоксидантный эффект дигидрокверцетина позволяет использовать его в качестве криопротектора, как вещество, предупреждающее клеточный отек, развивающийся в реактивную фазу отмирания [11].

Материалы и методы

Исследование проведено на 50 белых беспородных половозрелых крысах-самцах с массой тела 150-200 г. Животные были разбиты на 2 группы – контрольная, состояла из 30 животных, содержащихся в условиях вивария и включала три подгруппы – первая была интактна, у второй – вызывали местное отморожение с помощью ватного тампона, смоченного в жидком азоте в течение 1 минуты и они были забиты сразу, в дореактивный период отморожения. Животные третьей подгруппы также подвергались местному отморожению и были забиты через 30 минут после действия холода – в реактивный период холодовой травмы. Вторая группа состояла из 20 животных, также включала две подгруппы – первая была забита в дореактивный период холодовой травмы, вторая – в реактивный период отморожения. Животным этих подгрупп применяли дигидрокверцетин местно в виде 2,5 % мази на вазелиновой основе, сразу после воздействия жидким азотом.

Объектом исследования служил материал кожи задних конечностей белых лабораторных крыс, который был взят на морфологическое исследование. Для световой микроскопии: материал кожи крыс фиксировали в 10 % забуференном нейтральном растворе формалина, заливка осуществлялась в парафиновые блоки, из которых изготавливали срезы толщиной 5-7 мкм и для обзорного гистологического исследования окрашивали гематоксилином – эозином и метиленовым синим.

Для электронной микроскопии изготавливали полутонкие и ультратонкие срезы: для этого полученный материал фиксировался в глутаральдегиде, промывался в фосфатном буфере с сахарозой, дегидратировался в ацетоне восходящей концентрации, проводилась дофиксация четырехокисью осмия – иодид цинка. Для светооптического исследования применялись полутонкие срезы, которые окрашивались метиленовым синим. Для электронно-микроскопического исследования применялись ультратонкие срезы, контрастированные уранил – ацетатом и цитратом свинца [15].

В нашем исследовании для оценки уровня воспалительной реакции использовались антитела фирмы «Lab Vision» и набор реактивов фирмы «Хема» для иммуногистохимического окрашивания индуцибельной NO-синтазы срезов тканей. Исследование проводилось по стандартной методике [15].

Для оценки уровня перекисного окисления липидов в ходе эксперимента определяли содержание диеновых конъюгатов и гидроперекисей липидов в коже конечностей экспериментальных животных.

Фотосъемка парафиновых и полутонких срезов проводилась на микроскопе «Microphot FXA» (Nikon, Япония) при увеличении от 350 до 1 000 раз.

Ультратонкие срезы исследовались на трансмиссионном электронном микроскопе Technai G2 Spirit TWIN при увеличениях 20 000–85 000 раз.

Морфометрическое исследование проводилось на полуавтоматическом программно-аппаратном комплексе анализа изображения персонального компьютера со специальной программой для морфометрических вычислений «Морфометр».

Статистическую обработку проводили при помощи статистического пакета STATISTICA 6.0. Полученные цифровые данные были обработаны стандартными параметрическими методами с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Эпидермис кожи крыс является многослойным плоским ороговевающим эпителием, имеет слоистое строение и обладает высокими резистентными и регенераторными свойствами [1]. На гистологических препаратах интактных крыс отклонений от нормальной морфологии кожи не выявлено. Соотношение слоев в эпидермисе не изменено. Процессы кератинизации протекают без особенностей. В контрольной группе, подвергшейся локальному охлаждению и выведенной из эксперимента сразу после холодовой травмы – в дореактивный период холодовой травмы наблюдаются следующие морфологические изменения: границы между слоями эпидермиса и самими клетками «стусеваны», ядра клеток базального и зернистого слоев пикнотизированы. Эозин прокрашивает клетки эпидермиса диффузно, цитоплазма эпителиоцитов вакуолизована. В настоящее время установлены многочисленные факты, свидетельствующие о том, что клетки сосудистой стенки выделяют в кровоток соединения, влияющие на состояние иммуногенеза [5]. Со стороны сосудов сосочкового слоя дермы наблюдаются явления стаза, отмечается стойкий спазм сосу-

дов дермы, что свидетельствует о явлениях холодового стресса. Эритроциты склеены в «монетные столбики» и закупоривают капилляры, видны явления окклюзии в сосудах микроциркуляторного русла (рис. 1). Имеются данные, что у подвергнутых охлаждению животных отмечается более низкий уровень показателей тромбоцитов в ранние сроки патологического процесса, а также снижение активности регенераторных процессов [6, 7].

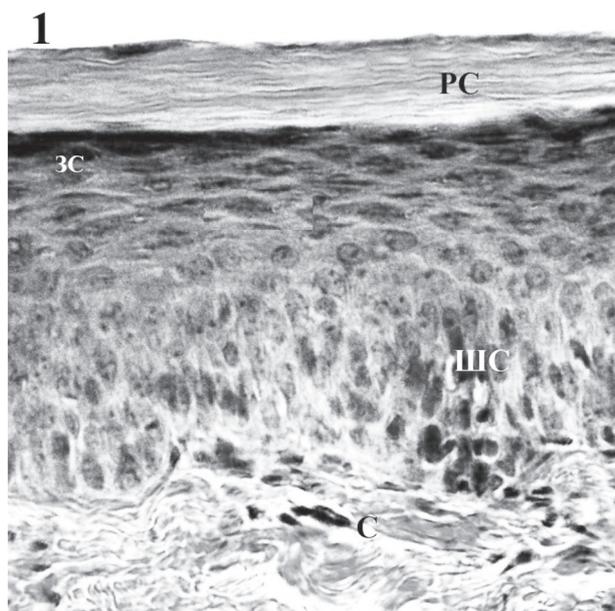


Рис. 1. Кожа в дореактивный период (контроль): РС – роговой слой; ЗС – зернистый слой; ШС – шиповатый слой; С – сосуды дермы. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение $\times 1\ 000$

В данном эксперименте на электронограммах выявляется нарушение контактов между кератиноцитами, появляются значительные межклеточные пространства, ядра кератиноцитов приобретают неровную форму. В базальном слое – увеличивается число мигрирующих клеток. Базальная мембрана приобретает неровный ход, содержит фрагментированные волокна (рис. 2).

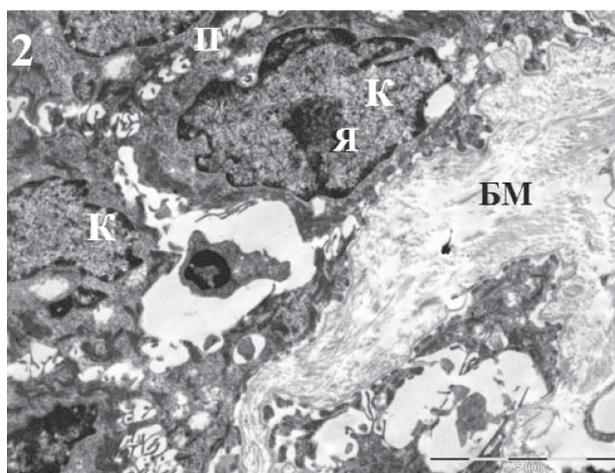


Рис. 2. Электронограмма эпидермиса. Дореактивный период (контроль): БМ – базальная мембрана; К – кератиноцит; Я – ядро кератиноцита; П – полудесмосомы. Окраска: нитрат свинца, уранил ацетат. Увеличение $\times 15\ 000$

При местном применении дигидрохверцетина со стороны эпидермиса наблюдается эффект отшелушивания, что указывает на кератолитическое действие дигидрохверцетина, процессы кератинизации активируются и протекают без особенностей, отек дермы умеренный (рис. 3).

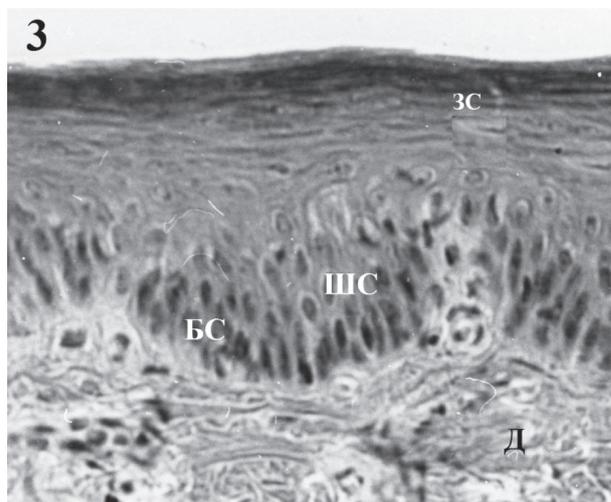


Рис. 3. Кожа крысы в дореактивный период, на фоне применения дигидрохверцетина: ЗС – зернистый слой; ШС – шиповатый слой; БС – базальный слой; Д – дерма. Окраска гематоксилином – эозином. Увеличение $\times 1\ 000$

В подгруппе, выведенной из эксперимента в реактивный период отморожения, в клетках эпидермиса шиповатого и зернистого слоев выявляется вакуолизация, нарушение межклеточных контактов, контур сосочкового слоя умеренно сглажен, со стороны сосудов дермы отмечаются реактивные явления стаза, перивасальное пространство умеренно отечно, дезорганизация волокон соединительной ткани выражена незначительно (рис. 4). На фоне применения дигидрохверцетина в реактивный период, роговые чешуйки приобретают более четкие границы, явления стаза в сосудах дермы незначительные (рис. 5). На электронограммах четко выявляются полудесмосомы, связывающие кератиноциты с базальной мембраной, которые сохраняют обычный план строения (рис. 6).

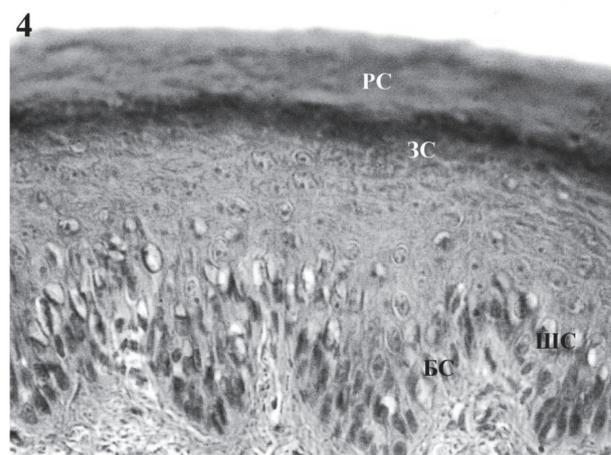


Рис. 4. Кожа крысы в реактивный период: РС – роговой слой; ЗС – зернистый слой; ШС – шиповатый слой; БС – базальный слой. Окраска гематоксилином – эозином. Увеличение $\times 1\ 000$

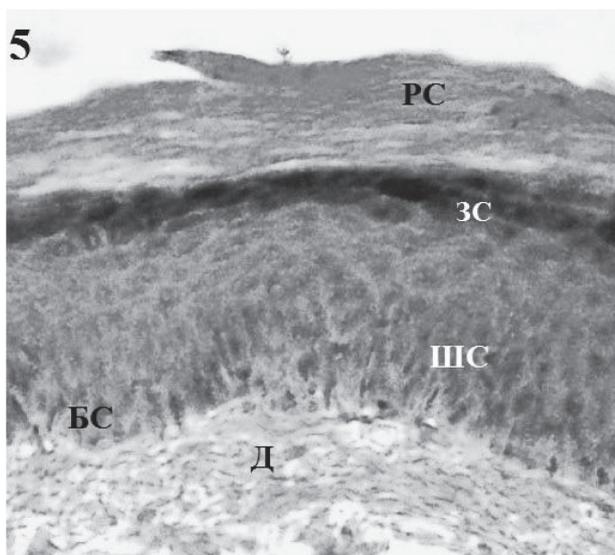


Рис. 5. Кожа крысы в реактивный период, на фоне применения дигидрохверцетина:
 РС – роговой слой; ЗС – зернистый слой; ШС – шиповатый слой;
 БС – базальный слой; Д – дерма.
 Окраска гематоксилином – эозином. Увеличение $\times 1\,000$

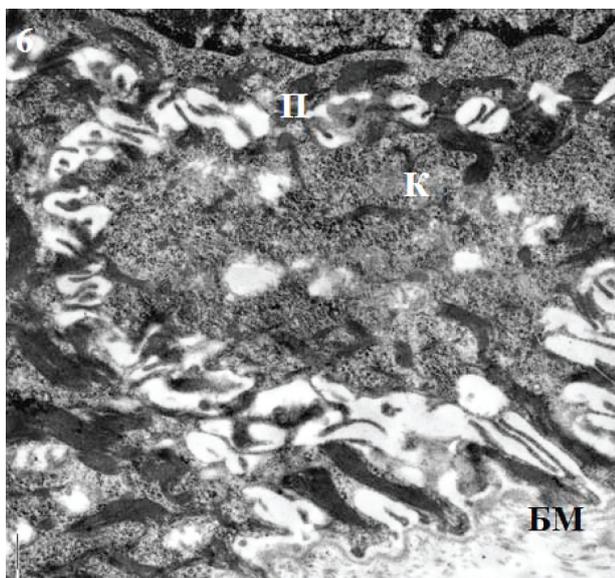


Рис. 6. Электронограмма кератиноцита базального слоя в реактивный период, на фоне применения дигидрохверцетина:
 К – кератиноцит; П – полудесмосомы; БМ – базальная мембрана.
 Окраска: нитрат свинца, уранил ацетат. Увеличение $\times 40\,000$

При иммуногистохимической реакции на выявление индуцибельной NO-синтазы в дерме интенсивность окрашивания увеличивается в сосочковом слое дермы, в основном в дореактивном периоде холодо-

вой травмы, что указывает на выраженность воспалительных явлений. Однако в группах, получавших дигидрохверцетин с криопротективной целью, интенсивность выявления индуцибельной NO – синтазы значительно ниже, по сравнению с контролем, что свидетельствует о противовоспалительном действии этого препарата [8].

Изучение основных показателей перекисного окисления липидов указывает на то, что, как в дореактивном, так и в реактивном периоде наблюдается рост уровня диеновых конъюгатов и гидроперекисей, по сравнению с интактными животными. Местное применение дигидрохверцетина в реактивный период умеренно снижает показатели диеновых конъюгатов и гидроперекисей (таблица).

Таблица

Показатели перекисного окисления липидов в коже крысы на фоне местного охлаждения и применении дигидрохверцетина (ДКВ), $M \pm m$

Экспериментальная группа	Диеновые конъюгаты (нмоль/г)	Гидроперекиси липидов (нмоль/г)
Интактная	0,015 \pm 0,003	0,027 \pm 0,003
Дореактивный период	контроль	0,021 \pm 0,004*
	применение ДКВ	0,024 \pm 0,006
Реактивный период	контроль	0,020 \pm 0,002*
	применение ДКВ	0,019 \pm 0,006**

Примечание. *р – по сравнению с интактными животными, достоверны при $p < 0,05$; **р – по сравнению с контрольной группой, достоверны при $p < 0,05$.

Все это свидетельствует о кератолитическом действии препарата дигидрохверцетина, его положительном влиянии на водно-электролитный, белковый обмен в коже и криопротективном эффекте при его применении.

Выводы

1. В дореактивный период холодовой травмы являются значительные структурные изменения в клетках эпидермиса: между кератиноцитами границы становятся нечеткие, имеются признаки отека, в дерме наблюдается спазм сосудов. В реактивный период, часть клеток эпидермиса сохраняют контакты, наблюдается умеренно выраженная дезорганизация волокон соединительной ткани.

2. При местном применении дигидрохверцетина в виде мази удается предотвратить развитие структурных повреждений кератиноцитов, уменьшить реактивные явления со стороны микроциркуляторного русла дермы, несколько снизить уровень реакции перекисного окисления липидов в коже.

Литература

1. Адашкевич В.П., Мяделец О.Д., Саларев В.В. Актуальная дерматология. – М.: Медицинская книга, 2000. – 300 с.
 2. Гоголев Л.С. Принципы диагностики и консервативного лечения местной холодовой травмы // Актуальные вопросы травматологии и ортопедии (Накостный, внутрикостный аппаратный остеосинтез, регенерация. Холодовая травма): сборник науч. тру-

дов под ред. проф. Н.И. Воронина. – Благовещенск: АГМА, 2003. – С. 135-136.
 3. Гайер Г. Электронная гистохимия. – М., 1974. – С. 221-233.
 4. Доровских В.А., Бородин Е.А., Целуйко С.С. Антиоксиданты в профилактике и коррекции холодового стресса. – Благовещенск: АГМА, 2001. – 183 с.
 5. Котельников В.П. Отморожения. – М.: Медицина, 1988. – 256 с.

6. Мяделец О.Д., Адашкевич В. П. Морфофункциональная дерматология. – М., 2006. – С. 655-656.
7. Ноздрин В.И., Барашкова С.А., Семченко В.В. Кожа и ее производные. – Омск – Орел, 2005. – С. 7-24.
8. Остроухова Л.А., Бабкин В.А., Бабкин Д.В., Малков Ю.А. Способ получения дигидрокверцетина // Патент РФ № 2158598. Б. И. – 2000. – № 31.
9. Пастухов Ю.В., Максимов А.Л., Хаскин В.В. Адаптация к холоду и условиям субарктики: проблемы термифизиологии. – Магадан, 2003. – 373 с.
10. Теселкин Ю.О., Жамбалова Б.А., Бабенкова И.В. и др. Антиоксидантные свойства дигидрокверцетина: учебник «Биофизика». – 1996. – Т. 41, № 3. – С. 620-624.
11. Habtemariam S. Flavanoids as inhibitors or enhancer of the cytotoxicity of tumor necrosis – alpha in L-929 tumor cells // J. Nat. Prod. – 1997. – Vol. № 8. – P. 775-778.
12. Gnaiger E., Kuznetsov A.V., Rieger O., Amberger A., Fuchs A, Stadlmann S., Eberl T., Margreiter R. Mitochondrial defects by intracellular calcium overload versus endothelial coldischaemia/reperfusion injury // Transplant International. – 2000. – Т. 13, № 7. – P. 555-557.
13. Belzer F.O., Southard J.H. Principles of solid-organ preservation by cold storage // Transplantation. – 1988. – № 45. – P. 673-676.
14. Pew J.C. A Flavonon from Douglas-Fir Heartwood // J. Am. Chem. Soc. – 1948. – Vol. 70, № 9. – P. 3031-3034.
15. Hauett T., Goujon J.M., Baumert H., Petit T., Carfettier M., Eugene M., Vandewalle A. Polyethylene glycol reduces the inflammatory injury due to cold ischemia/reperfusion in autotrans-plantated pig kidneys // Kidney international. – 2005. – Т. 62, № 2. – P. 654-667.

Literature

1. Adaskevich V.P., Myadelets O.D., Salarev V.V. Current dermatology. – М.: Medical book, 2000. – P. 300.
2. Gogolev L.S. Local cold trauma diagnosis approach and conservative therapy // Current issues of traumatology and orthopaedy (extra-cortical, intraosseous osteosynthesis and osteosynthesis with Ilizarov frame, regeneration. Cold trauma): collection of scientific papers edited by prof. Voronin N.I. – Blagoveshensk: AGMA, 2003. – P. 135-136.
3. Geier G. Electronic histochemistry. – М., 1974. – P. 221-233.
4. Dorovskikh V.A., Borodin E.A., Tseluiko S.S. Antioxidants in prophylaxis and correction of cold stress. – Blagoveshensk: AGMA, 2001. – P. 183.
5. Kotelnikov V.P. Freezing injury. – М.: Medicine. – 1988. – P. 256.
6. Myadelets O.D., Adaskevich V.P. Morphofunctional dermatology. – М., 2006 – P. 655-656.
7. Nozdrin V.I., Barashkova S.A., Semchenko V.V. Skin and it's derivates. – Омск-Орел, 2005. – P. 24.
8. Ostroukhova L.A., Babkin V.A., Babkin D.V., Mal'kov Yu.A. Dihydroquercetin production process // Patent of Russian Federation № 2158598. B. I. 2000. – № 31.
9. Pastukhov Yu.V., Maximov A.L., Khaskin V.V. Adaptation to cold and subarctic zone conditions: issues of thermophysiology. – Магадан, 2003. – P. 373.
10. Teselkin Yu.O., Zhambalova B.A., Babenkova I.V. Antioxidative properties of dihydroquercetine. «Biophysics» manual, 1996. – Vol. 41, 3rd publication. – P. 620-624.
11. Habtemariam S. Flavanoids as inhibitors or enhancer of the cytotoxicity of tumor necrosis – alpha in L-929 tumor cells // J. Nat. Prod. – 1997. – Vol. № 8. – P. 775-778.
12. Gnaiger E., Kuznetsov A.V., Rieger O., Amberger A., Fuchs A, Stadlmann S., Eberl T., Margreiter R. Mitochondrial defects by intracellular calcium overload versus endothelial coldischaemia/reperfusion injury // Transplant International. – 2000. – Т. 13. – № 7. – P. 555-557.
13. Belzer F.O., Southard J.H. Principles of solid-organ preservation by cold storage // Transplantation. – 1988. – № 45. – P. 673-676.
14. Pew J.C. A Flavonon from Douglas-Fir Heartwood // J. Am. Chem. Soc. – 1948. – Vol. 70, №9. – P. 3031-3034.
15. Hauett T., Goujon J.M., Baumert H., Petit T., Carfettier M., Eugene M., Vandewalle A. Polyethylene glycol reduces the inflammatory injury due to cold ischemia/reperfusion in autotrans-plantated pig kidneys // Kidney international. – 2005. – Vol. 62, № 2. – P. 654-667.

Координаты для связи с авторами: Малюк Екатерина Алексеевна – аспирант кафедры гистологии и биологии АГМА; Целуйко Сергей Семенович – д-р мед. наук, профессор, проректор по научной работе АГМА, тел. 8-(4162)-31-90-20; Красавина Надежда Павловна – д-р мед. наук, профессор кафедры гистологии и биологии АГМА.

