

УДК 616-001.14-092.9-085

*С.И. Миронченко, Т.В. Звягинцева, М.М. Мишина\***Национальный фармацевтический университет**\*Харьковский национальный медицинский университет*

## МЕХАНИЗМЫ УЛЬТРАФИОЛЕТ-ИНДУЦИРОВАННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ КОЖИ И ИХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ

Воздействие ультрафиолетового облучения характеризуется нарушением окислительного гомеостаза в виде активации процессов перекисного окисления липидов с накоплением первичных и вторичных продуктов и истощения ферментативного звена антиоксидантной системы (каталазы и супероксиддисмутазы) в крови. В эритемный период УФ-индуцированных повреждений кожи поддержке состояния окислительного стресса способствует усиленная продукция оксида азота (NO) с резкой активацией индуцибельной NO-синтазы и накоплением метаболитов NO. При применении исследуемых мазей наблюдается снижение (мази тиотриазолина и метилурацила) или нормализация (мази тиотриазолина и метилурацила, содержащие наночастицы серебра) основных проявлений УФ-индуцированных повреждений кожи. Включение наночастиц серебра в субстанцию тиотриазолина нивелирует повышенную чувствительность к инфекционным агентам. В условиях *in vitro* исследуемые клинические штаммы *S. aureus*, *P. aureginosa*, *H. influenzae*, *S. pyogenes*, *E. coli* проявляют высокую чувствительность к субстанции тиотриазолина с наночастицами серебра в 18.00 и в то же время остаются резистентными в 8.00 и 12.00.

**Ключевые слова:** ультрафиолет-индуцированные повреждения кожи, окислительно-антиоксидантные и NO-ергические механизмы, мазь тиотриазолина, мазь метилурацила, наночастицы серебра.

Механизмы ультрафиолет(УФ)-индуцированных повреждений кожи разнообразны, однако ведущим является патологическое влияние оксидативного стресса и иммуносупрессии [1, 2]. Окислительный стресс формируется в результате дисбаланса между состоянием антиоксидантной (АО) защиты и интенсивностью действия прооксидантных факторов. Ультрафиолетовое облучение (УФО) также индуцирует продукцию оксида азота (NO) – основного медиатора межклеточных взаимодействий, в том числе и в иммунной системе [3]. Под воздействием воспалительных цитокинов и активных форм кислорода экспрессируется индуцибельная NO-синтаза (iNOS), обеспечивающая синтез большого количества NO, способного оказывать токсическое, повреждающее действие на клетку [3]. Оксидативные процессы актуализируют проблему нитрозивного стресса при УФО.

Для изучения механизмов действия УФО использовали препараты с установленной или потенциальной антиоксидантной актив-

ностью, способные блокировать УФО-индуцированное окисление.

Поскольку УФО обладает иммуносупрессорным эффектом, желательно, чтобы препараты обладали антимикробным действием. Из данных литературы известно, что наночастицы многих металлов проявляют антибактериальное действие, из них наиболее эффективными являются наночастицы серебра [4].

Нами совместно с Международным центром электронно-лучевых технологий Института электросварки им. Е.О. Патона НАН Украины созданы новые субстанции, которые содержат тиотриазолин (обладает антиоксидантным действием), метилурацил (обладает противовоспалительным действием) и наночастицы серебра [5]. Метод получения наночастиц серебра, предложенный акад. Б.О. Мовчаном [6], заключается в электронно-лучевом испарении и конденсации веществ в вакууме. На основе субстанции совместно с ОАО «Химфармзавод «Красная

© С.И. Миронченко, Т.В. Звягинцева, М.М. Мишина, 2016

звезда» изготовлены мази тиотриазолина и метилурацила, которые содержат наночастицы серебра [7].

Целью данного исследования было изучение окислительно-антиоксидантных и NO-ергических механизмов развития УФ-индуцированных повреждений кожи и возможность их фармакологической коррекции мазями тиотриазолина и метилурацила, содержащими наночастицы серебра.

**Материал и методы.** Исследования проведены *in vivo* и *in vitro*. *In vivo* выполнены на морских свинках-альбиносах, разделенных на шесть групп: 1-я – интактные; 2-я – подвергшиеся локальному УФО, без лечения (контроль); 3-я – подвергшиеся локальному УФО, с применением мази метилурациловой (ОАО «Нижфарм», Россия); 4-я – подвергшиеся локальному УФО, с применением мази тиотриазолина 2 % (ОАО «Химфармзавод «Красная звезда», г. Харьков); 5-я – подвергшиеся локальному УФО, с применением мази, содержащей метилурацил и наночастицы серебра (0,0006 %); 6-я – подвергшиеся локальному УФО, с применением мази, содержащей тиотриазолин и наночастицы серебра (0,00081 %). Данные концентрации получены в результате скрининговых исследований противовоспалительного действия мазей с разной концентрацией наночастиц серебра [5].

Эритему вызывали облучением выбритого участка кожи УФ-лучами с помощью ртутно-кварцевого облучателя (ОКН-11-М), помещенного на расстоянии 10 см от животного, в течение 2 мин. Уровень повреждающего действия оценивали по интенсивности эритемной реакции [8]. Мази наносили на поврежденный участок кожи за 1 час до и через 2 часа после облучения, а затем ежедневно, вплоть до исчезновения эритемы. В крови через 4 часа и на 3-и сутки после облучения определяли содержание суммарных метаболитов NO, нитрит-аниона, нитратов спектрофотометрическим методом [9], концентрацию iNOS [10] и продуктов ПОЛ по уровню диеновых конъюгат (ДК), ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) и антиоксидантной системы (АОС) по активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы [11–14]. 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 [9].

Антибактериальные свойства субстанции тиотриазолина с разной концентрацией наночастиц серебра (1,9; 0,95; 0,45; 0,025; 0,12; 0,06; 0,024; 0,012; 0,006 мг / мл) изучали *in vitro* по стандартной методике диффузии субстанции в агар (метод лунок) на клинические и референтные штаммы бактерий *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherchia coli* в разное время суток (в 8.00, 12.00, 18.00) [15, 16].

Полученные данные обработали статистическим методом с помощью t-критерия Стьюдента [17].

**Результаты и их обсуждение.** Под влиянием УФО у всех морских свинок развилась эритема. На фоне лечения мазями, в большей степени при использовании мазей тиотриазолина и метилурацила с наночастицами серебра, интенсивность эритемной реакции уменьшается [8].

Несмотря на то, что УФ-лучи глубоко не проникают в ткани, они все же обладают выраженным общим действием благодаря всасыванию в кровоток биологически активных веществ и токсических продуктов, образующихся в коже. Нами получены результаты, которые совпадают с данными литературы [1, 2] о том, что воздействие УФО приводит к окислительно-антиоксидантному дисбалансу в крови – активации ПОЛ и уменьшению активности АО-ферментов. Установлено, что в крови увеличивается концентрация ДК (через 4 часа и на 3-и сутки после облучения) и ТБК-активных продуктов (на 3-и сутки после облучения), уменьшается АО-резерв крови (активность СОД и каталазы на 3-и сутки после облучения).

Одним из механизмов стабилизации нарастания каскадной реакции ПОЛ при УФО является наращивание АО-ресурсов, что может быть достигнуто использованием антиоксидантов. Препараты (в нашем случае мазь тиотриазолина с наночастицами серебра) с наиболее выраженной АО-активностью, ограничивая перекисный каскад, приводят к значительному снижению интенсивности эритемы.

Согласно современным представлениям, существует тесная взаимосвязь между процессами свободнорадикального окисления, инициаторами которого являются активные формы кислорода (АФК), АО-системой и системой NO [18].

Нами виявлено, що однократне УФО шкіри викликає активацію iNOS в течение трех суток и интенсифікацію синтезу NO, что підтверджується збільшенням його метаболітів в крові (суммарних, нітрит-аніона, нітратів в течение трех суток). Особого внимания заслуживают чрезмерно высокие концентрации наиболее токсичного метаболита – нітрит-аніона [19]. В норме iNOS, как известно, не синтезується, но под влиянием супероксида и цитокинов происходит сверхэкспрессия iNOS и синтез NO в количествах на несколько порядков выше, чем при работе cNOS [1,18]. Поэтому избыточный уровень нітрит-аніона и нітратів свидетельствует о высокой интенсивности синтеза NO ферментом iNOS. Резкое повышение активности iNOS, приводящее к накопленію метаболітів NO в крові, свидетельствует о серьезных иммунологических сдвигах, возникающих под влиянием локального УФО шкіри.

Под влиянием мази тиотриазолина и метилурацила при УФО шкіри уменьшаются активность iNOS и концентрация суммарных метаболітів NO, нітратів и нітрит-аніона в крові на 3-и сутки.

NO играет важную роль в коже, регулируя многие физиологические процессы в ней. Повышение активности iNOS при различных патологических процессах обуславливает продукцию высоких концентраций NO, которые индуцируют ПОЛ, снижают АО-потенциал клеток, повреждают цепь ДНК [20].

Действительно, на протяжении всего эксперимента определяется повышение содержания суммарных метаболітів NO в коже. Так, через 2 часа после облучения наблюдается их увеличение в 1,7 раза, через 4 часа – в 1,8 раза по сравнению с интактными животными. Максимальное увеличение концентрации суммарных метаболітів 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.

Уровень нітратів в коже также повышается. Так, через 2 и 4 часа после облучения уровень нітратів увеличивается в 1,7 и 1,8 раза соответственно 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 нітратів относительно предыдущего срока, однако их уровень остается высоким, превышая норму в 1,9 раза.

Виявлено збільшення продукції нітрит-аніона в шкірі тварин на протязі всього періода дослідження. 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 нітрит-аніона имеет тенденцию к уменьшению, однако на 8-е сутки сохраняется высоким (в 1,8 раза) по сравнению с таковыми у интактных животных. Полученные данные свидетельствуют о значительном накопленію в коже концентрации всех метаболітів NO в условиях УФ-индуцированного стресса.

Использование в этих условиях препаратов, которые обуславливают, очевидно, торможение активности iNOS, выдвинулось достаточно эффективным. Так, при применении мази метилурациловой отмечается снижение метаболітів NO на 3-и сутки после облучения с нормализацией этих показателей к 8-м суткам. Использование мази метилурациловой с наночастицами серебра при УФО предупреждает возрастание концентрации всех метаболітів NO в коже. При этом величина исследуемых показателей на протяжении всего периода наблюдения не отличается от таковой в коже интактных морских свинок.

Следующим этапом исследования было изучение антибактериальной активности наноконпозиции, содержащей тиотриазолин и наночастицы серебра, в зависимости от концентрации на клинические и референтные штаммы грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Исследования проводили в разное время суток, поскольку известно, что биоритмологический подход к изучению биологических свойств микроорганизмов позволяет выявить варьирование признака в течение суток, отражает адаптацию возбудителя к меняющимся условиям существования, в том числе антибиотикочувствительность [21].

Виявлено антибактеріальне действие субстанції тиотриазолина, содержащий наночастицы серебра, на клинические штаммы *S. aureus*, *P. aureginosa*, *H. influenzae*, *S. pyogenes*, *E. coli*. Исследуемые клинические

штаммы проявляють високу чутливість к субстанції тиотриазоліна с наночастицями срібра в 18.00 і були резистентні в 8.00 і 12.00 в то время, когда в даном стационаре проводяться антимікробна терапія і антисептичні заходи, що виражається модифікаційною (адаптаційною) змінчивістю тестируємих клінічних штаммов по сравнению с референтними штаммами, проявляючими високу чутливість к субстанції тиотриазоліна с наночастицями срібра, во всех концентраціях незалежно от времени суток. Субстанція тиотриазоліна с наночастицями срібра незалежно от концентрації проявляє високу активність в отношении *S. aureus* і *P. aeruginosa*. Виявлена найбільш ефективна концентрація субстанції тиотриазоліна с наночастицями срібра, которая характеризується широким спектром антимікробного дієвства – 0,95 мг/мл.

Используя лекарственные средства как инструмент исследования механизмов действия УФО, мы не только получаем доказательную базу эффективности фармакологической коррекции, но и расширяем представление о патогенезе УФ-индуцированных повреждений кожи.

### Литература

1. Janovska J. Sun induced skin damage and immunosuppression / J. Janovska, J. Voicnehovska, L. Kasparane // Romania J. Clinical and experimental dermatology. – 2015. – May. – P. 84–90.
2. Photoprotective effect of Tea and its extracts against ultraviolet radiation-induced skin disorders / Na-Na Li, Li Deng, Li-Ping Xiang, Yue-Rong Liang // Topical J. Pharmaceutical Research. – 2014. – № 13 (3). – P. 475–483.
3. Opländer C. The role of photolabile dermal nitric oxide derivatives in ultraviolet radiation (UVR)-induced cell death / C. Opländer, C.V. Suschek // Intern. J. Molecular Sciences. – 2013. – № 14. – P. 191–204.
4. Silver nanoparticles as potential antibacterial agent / G. Franci, A. Falanga, S. Galdiero et al. // Molecules. – 2015. – № 20. – P. 8856–8874.
5. Пат. 77777 Україна, МПК А61К 9/06 (2006.01) А61К 33/38 (2006.01) А61Р 29/00. Спосіб підвищення протизапальної активності фармацевтичних засобів у м'якій лікарській формі / Лісовий В. М., Звягінцева Т. В., Трутаєв І. В., Миронченко С. І.; заявник та власник Трутаєв І. В. – № u201210159 ; заявл. 27.08.2012 ; опубл. 25.02.2013. Бюл. № 4/2013.
6. Мовчан Б.А. Электронно-лучевая гибридная нанотехнология осаждения неорганических материалов в вакууме / Б.А. Мовчан // Актуальные проблемы современного материаловедения. – 2008. – Т. 1. – С. 227–247.
7. Пат. 77770 Україна, МПК А61К 9/06 (2006.01) А61К 33/38 (2006.01) А61Р 29/00 Фармацевтичний засіб з протизапальною активністю, виконаний у м'якій лікарській формі / Лісовий В.М., Звягінцева Т.В., Трутаєв І.В., Миронченко С.І.; заявник та власник Трутаєв І.В. – № u201210131 ; заявл. 23.08.2012 ; опубл. 25.02.2013. Бюл. № 4/2013.
8. Миронченко С.И. Нарушения метаболизма оксида азота при ультрафиолет-индуцированных повреждениях кожи морских свинок и их фармакологическая коррекция / С.И. Ми-

### Выводы

1. Развитие ультрафиолетовой эритемы характеризуется нарушением окислительного гомеостаза в виде активации процессов ПОЛ с накоплением первичных и вторичных продуктов и истощения ферментативного звена антиоксидантной системы (каталазы и супероксиддисмутазы) в крови.

2. В эритемный период УФ-индуцированных повреждений кожи поддержке состояния окислительного стресса способствует усиленная продукция NO с резкой активацией iNOS и накоплением метаболитов NO, что свидетельствует об иммуносупрессии.

3. Включение наночастиц серебра в субстанцию тиотриазоліна нивелірує підвищену чутливість к інфекційним агентам.

4. Исследуемые клинические штаммы бактерий проявляют высокую чувствительность к субстанции тиотриазоліна с наночастицями срібра в 18.00 і в то же время остаются резистентными в 8.00 і 12.00.

Использование лекарственных средств с антиоксидантной и iNOS-блокирующей активностью открывает широкие возможности профилактики и коррекции УФ-индуцированных повреждений.

ронченко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2015. – Т. 15. – № 3 (51), Ч. 1. – С. 199–204.

9. *Метельская В.А.* Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота / В.А. Метельская, Н.Г. Гуманова // Клини. лаб. диагностика. – 2005. – № 6. – С. 15–18.

10. Вплив ентеросорбентів на активність NO-синтази у клітинах щурів за умов введення афлатоксину В1 / Х.М. Головчак, І.В. Панчук, Г.Л. Антоняк, О.Є. Возна // Біологія тварин. – 2014. – Т. 16, № 1. – С. 55–62.

11. *Скорняков В.И.* Продукты перекисного окисления липидов в спинномозговой жидкости у больных с черепно-мозговой травмой / В.И. Скорняков, Л.А. Кожемякин, В.В. Смирнов // Лаб. дело. – 1988. – № 8. – С. 14–16.

12. *Карпищенко А.И.* Медицинская лабораторная диагностика (программы и алгоритмы) / А.И. Карпищенко // Спектрофотометрическое определение продуктов перекисного окисления липидов. – С.-Петербург: Интермедика. – 1997. – С. 48–52.

13. *Костюк В.А.* Простой и чувствительный метод определения активности супероксид-дисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.В. Ковалева // Вопр. мед. химии. – 1990. – № 2. – С. 88–91.

14. *Барабой В.А.* Методические особенности исследования перекисного окисления и радиация / В.А. Барабой, В.Э. Орел, И.М. Карнаух. – К.: Наук. думка. – 1991. – С. 52–75.

15. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. Приказ Минздрава СССР от 22.04.1985 г. № 535. – Москва, 1985. – 65 с.

16. Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів». Наказ МОЗ України від 05.04.07 № 167. – К., 2007. – 63 с.

17. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М.: Практика, 1998. – 459 с.

18. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков и др. – М.: Слово, 2006. – 556 с.

19. *Звягинцева Т.В.* Метаболиты оксида азота при ультрафиолет-индуцированных повреждениях кожи морских свинок / Т.В. Звягинцева, С.И. Миронченко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2014. – Т. 14, № 3 (47). – С. 231–234.

20. *Смирнова И.Ю.* Роль оксида азота в развитии заболеваний кожи / И.Ю. Смирнова, Л.М. Огородова, И.А. Деев // Вопросы современной педиатрии. – 2009. – Т. 8, № 4. – С. 90–94.

21. Биоритмы биологических свойств *Staphylococcus aureus* как фактор адаптации при госпитальной инфекции / Т.Х. Тимохина, В.В. Варницына, Я.И. Паромова и др. // Мед. наука и образование Урала. – 2009. – № 2/62. – С. 100–101.

**С.І. Миронченко, Т.В. Звягинцева, М.М. Мішина**

#### МЕХАНІЗМИ УЛЬТРАФІОЛЕТ-ІНДУКОВАНИХ УШКОДЖЕНЬ ШКІРИ ТА ЇХ ФАРМАКОЛОГІЧНА КОРЕКЦІЯ

Вплив ультрафіолетового опромінення характеризується порушенням окисного гомеостазу у вигляді активації процесів перекисного окислення ліпідів з накопиченням первинних і вторинних продуктів та виснаження ферментативної ланки антиоксидантної системи (каталази і супероксиддисмутази) в крові. В еритемний період УФ-індукованих ушкоджень шкіри підтримці стану окисного стресу сприяє посилена продукція оксиду азоту (NO) з різкою активацією індукуючої NO-синтази і накопиченням метаболітів NO. При застосуванні досліджуваних мазей спостерігається зниження (мазі тіотриазоліну і метилурацилу) або нормалізація (мазі тіотриазоліну і метилурацилу з наночастками срібла) основних проявів УФ-індукованих ушкоджень шкіри. Включення наночасток срібла в субстанцію тіотриазоліну нівелює підвищену чутливість до інфекційних агентів. В умовах *in vitro* досліджувані клінічні штами *S. aureus*, *P. aereginosa*, *H. influenzae*, *S. pyogenes*, *E. coli* проявляють високу чутливість до субстанції тіотриазоліну з наночастками срібла о 18.00 і в той же час залишаються резистентними о 8.00 і 12.00.

**Ключові слова:** ультрафіолет-індуковані ушкодження шкіри, окислювально-антиоксидантні і NO-ергічні механізми, мазь тіотриазоліну, мазь метилурацилу, наночастки срібла.

**S.I. Myronchenko, T.V. Zvyagintseva, M.M. Mishina**

**MECHANISMS OF ULTRAVIOLET-INDUCED SKIN DAMAGES AND ITS PHARMACOLOGICAL CORRECTION**

Exposure to ultraviolet radiation is characterized by impaired oxidative homeostasis in the form of activation of lipid peroxidation with accumulation of primary and secondary products and depletion of enzymatic link of antioxidant system (catalase and superoxide dismutase) in blood. In erythematous period of UV-induced skin damage oxidative stress is promoted by the enhanced production of nitric oxide (NO) with a sharp activation of inducible NO-synthase and accumulation of NO metabolites. Administration of the ointments under investigation was found to contribute to a reduction (thiotriazoline and methyluracil ointments) or normalization (thiotriazoline and methyluracil ointments containing silver nanoparticles) of the main manifestations of UV-induced skin damage. The inclusion of silver nanoparticles in thiotriazoline compound eliminates increased sensitivity to infectious agents. In vitro studies showed that clinical strains of *S. aureus*, *P. aureginosa*, *H. influenzae*, *S. pyogenes*, *E. coli* exhibit high sensitivity to thiotriazoline compound with silver nanoparticles in 18.00 and at the same time remain resistant at 8.00 and 12.00.

**Key words:** *UV-induced skin damages, oxidation-antioxidant and NO-ergic mechanisms, thiothriazoline ointment, methyluracil ointment, silver nanoparticles.*

*Поступила 24.05.16*