

НАНОФОРМА ПРЕПАРАТУ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ – ПЕРСПЕКТИВНИЙ МЕТОД ЛІКУВАННЯ КОНТАКТНОГО ДЕРМАТИТУ

Резюме. Значна поширеність дерматитів та часті загострення роблять надзвичайно актуальним пошук нових методів їх лікування. Відомо, що оксидативний стрес є невід’ємною ланкою патогенезу різних видів дерматитів. Враховуючи це, перспективним є застосування речовин та субстанцій з антиоксидними властивостями. Останніми роками для покращення біодоступності ліків та полегшення їх проникнення через *stratum corneum* у дерматології все частіше використовують наночастинки.

Мета дослідження – вивчити особливості реорганізації структури шкіри при експериментальному контактному дерматиті та його корекції препаратами супероксиддисмутази (СОД) у вільній та нанокапсульованій формах.

Матеріали і методи. Експеримент проведено на 35 статевозрілих білих щурах, яких було поділено на 4 групи: перша – інтактні тварини; друга – щури з модельованим контактним нікелевим дерматитом (КД); третя – тварини, які для корекції отримували вільну форму СОД (КД + СОД); та щури четвертої групи, які отримували наноформу СОД (КД + нано-СОД). Полімерні хітозанові наночастинки з інкапсульованою СОД готували за методикою Z. Hussain et al. (2013). Препарати корекції наносили на уражені ділянки шкіри два рази на добу протягом 7 днів. Тварин виводили з експерименту на 20 добу, дотримуючись усіх правил біоетики. Для оцінки структурних змін проводили гістологічне дослідження шкіри за загальноприйнятими методиками.

Результати досліджень та їх обговорення. На мікроскопічному рівні встановлено, що у центральних ділянках шкіри при нікелевому дерматиті відбувається глибока деструкція епідермісу та дерми з вогнищевими виразковими uszkodженнями; змінюються ядра та цитоплазма кератиноцитів, фібробластів, руйнуються волокна сполучної тканини. Застосування вільної форми СОД не призводить до значного покращення. При аплікації її наноформи спостерігається активація процесів регенерації. У центральній ділянці шкіри гістологічно спостерігається закриття дефектів. Формується новоутворений пласт епітеліоцитів, у якому наявне диференціювання шарів. Зменшуються ознаки запалення у дермі.

Висновки. Застосування супероксиддисмутази, інкапсульованої у хітозанові наночастинки, має ряд переваг порівняно із застосуванням звичайної її вільної форми. Спостерігається більш активна та якісна репарація uszkodжених структур шкіри. Використання наноформ препаратів з антиоксидними властивостями є перспективним напрямом для подальшого вивчення та впровадження у клінічну практику.

Ключові слова: структурні зміни; шкіра; дерматит; нікель; супероксиддисмутаза; наноінкапсульована форма.

ВСТУП Високий рівень захворюваності на дерматити серед дітей і дорослого населення, низький відсоток видужання та часті загострення роблять надзвичайно актуальним пошук нових методів та засобів для їх лікування [1–3]. Відомо, що розвиток оксидативного стресу є невід’ємною ланкою патогенезу різних видів дерматитів [4–7]. Пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ) – це есенціальний елемент підтримки життєдіяльності клітини, однак при порушенні балансу між про- та антиоксидантною системою організму, його гіперактивація запускає каскад патологічних процесів [5, 7]. Враховуючи це, застосування речовин та субстанцій з антиоксидними властивостями для лікування дерматитів є патогенетично обґрунтованим. Супероксиддисмутаза (СОД), як ланка ендогенного захисту організму та потужний антиоксидант, наявна як у цитоплазмі (Cu-Zn СОД), так і у мітохондріях (Mg-СОД) клітин. Її препарати сьогодні активно застосовуються у дерматології [8, 9], однак їх вплив на структурну організацію шкіри при дерматитах вивчено недостатньо.

Враховуючи те, що черезшкірна доставка діючої речовини до глибоких шарів епідермісу та дерми через *stratum corneum* (природний бар’єр, що лімітує проникнення лікувальних засобів) утруднена, перспективним є застосування нанотехнологій з метою створення полімерних наночастинок з інкапсульованими в них препаратами. Сьогодні застосовують ліпосоми, полімерні наночастинки, наноемосії, дендримери тощо [10, 11].

Метою дослідження стало встановлення особливостей реорганізації структури шкіри при експериментальному нікелевому дерматиті при застосуванні у якості корекції препаратів СОД у вільній та нанокапсульованій формах.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Досліди проведено на 35 статевозрілих білих щурах-самцях масою 180–220 г, яких

методом сліпої вибірки було рандомізовано на чотири групи: перша – інтактні тварини (5 особин); друга – тварини з експериментальним контактним нікелевим дерматитом (КД) (10 особин); третя – щури з КД, яким для корекції застосовували СОД (КД + СОД); четверта – щури з КД, яким наносили інкапсульовану СОД (КД + нано-СОД). При проведенні досліджень дотримувалися міжнародних правил та принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) і Закону України “Про захист тварин від жорстокого поводження” (№ 1759-VI від 15.12.2009) та Директиви Європейського Союзу 2010/10/63 ЕУ щодо експериментів на тваринах.

Контактний нікелевий дерматит моделювали шляхом щоденного нанесення протягом 12 днів на ретельно вистрижену ділянку шкіри (площею 3x3 см) щурів 4 г водного ланоліну, що містив 5 % NiSO₄.

Для досліджень використовували пегільовану супероксиддисмутазу (ПЕГ-СОД) (Sigma, Aldrich, USA). Наночастинки з інкапсульованою ПЕГ-СОД готували за методикою Z. Hussain et al. [12]. Полімерні хітозанові наночастинки готували шляхом іонного “зшивання” хітозану з триполіфосфатом натрію (TPP). Розчин хітозану (0,2 %) готували на 1 % розчині оцтової кислоти (pH=5) і інкубували, перемішуючи з ПЕГ-СОД (10 мг/мл) протягом 30 хв при кімнатній температурі. До 25 мл інкубаційної суміші по краплях додавали 10 мл 0,1% водного розчину TPP. Суміш постійно перемішували за допомогою магнітної мішалки (700 об./хв). Отримані наночастинки відцентрували (28 000 об./хв.) протягом 30 хв. Розмір наночастинок визначали за допомогою морфометричної програми Відео-Тест – 5.0, КААРА ImageBase, за даними електронної мікроскопії їх розмір коливався від 40 до 100 нм.

ПЕГ-СОД та її нанокапсульовану форму у вигляді суміші з водним ланоліном після формування контактного нікелевого дерматиту наносили протягом 7 днів на уражену ділянку шкіри 2 рази на добу. Декапітацію тварин проводили під тіопенталовим наркозом на 20 день експерименту. Забір матеріалу для гістологічних досліджень проводили згідно із загальноприйнятими методиками. Шматочки шкіри фіксували в 10 % розчині нейтрального формаліну, зневоднювали та заливали в парафінові блоки. Отримані на санному мікротомі зрізи забарвлювали гематоксилином та еозином. Гістологічні препарати вивчали за допомогою світлового мікроскопа SEOSCAN та фотодокументували за допомогою відеокамери Vision CCD Camera.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження, проведені нами, показали, що максимальне ураження шкіри при контактному нікелевому дерматиті спостерігається у центральній ділянці контакту з подразником; разом з тим, як на периферії його характер не такий тяжкий (рис. 1).

На поверхні виразок формується кірка з клітинного детриту, фібрину, яка тісно спаяна з підлеглою uszkodженою тканиною і розмежована від здорових тканин грануляціями. Має місце виражена запальна реакція у дермі з ураженням фіброblastів та фіброцитів. Суттєво ушкоджуються придатки шкіри: деструкція структур волосся, наявне руйнування гландуцитів секреторних відділів та епітеліоцитів вивідної протоки у сальних залозах. Епідермальний пласт потовщується, є акантозні розростання епідермісу. Порушується пошарове розташування кератиноцитів, наявне їх руйнування. Більшість клітин усіх шарів має пікнотично змінені, інтенсивно базofilні ядра, ушкоджуються міжклітинні контакти, збільшуються міжклітинні простори. Зернистий шар на значній ділянці зруйнований, інфільтрований лейкоцитами, шар рогових лусочок відшаровується. У межах потовщеного епідермісу відмічаються значні округло-овальні порожнини, заповнені гомогенізованими еритроцитами та ушкодженими лейкоцитами. У периферійних ділянках наявний гіперкератоз (збільшення рогового шару), його підвищене розпушення та злуцнення, паракератоз. Ушкодження дерми, її придатків та судин у периферійних ділянках менші, ніж у центральних.

Проведені мікроскопічні дослідження шкіри тварин при експериментальному дерматиті за умов застосування вільної форми препарату ПЕГ-СОД показали, що зміни її структурних компонентів були неоднакові у місцях дії ушкоджувального чинника. Все ще спостерігаються ділянки глибокої деструкції епідермального пласта, сосочкового і сітчастого шарів дерми та її придатків (рис. 2).

Відмічається крайова епітелізація, пласт клітин підростає під ушкоджений епідерміс та сприяє закриттю дефекту. Наявна вогнищева запальна реакція у дермі (рис. 3). Мікроскопічно будова шкіри поза зоною ушкодження подібна до шкіри тварин інтактної групи.

При вивченні гістологічної картини структур шкіри при експериментальному контактному нікелевому дерматиті за умов застосування наноформи ПЕГ-СОД встановлено, що стан структурних компонентів покращується, виявляються ознаки активації регенераторних процесів, а зміни шкіри менші, ніж у нелікованій групі. У центральній ділянці гістологічно спостерігається закриття дефектів шкіри щільним шаром – кіркою, що розташована на місці повністю зруйнованого епідермісу і сосочкового шару дерми та складається з клітинного детриту та фібрину. Під нею

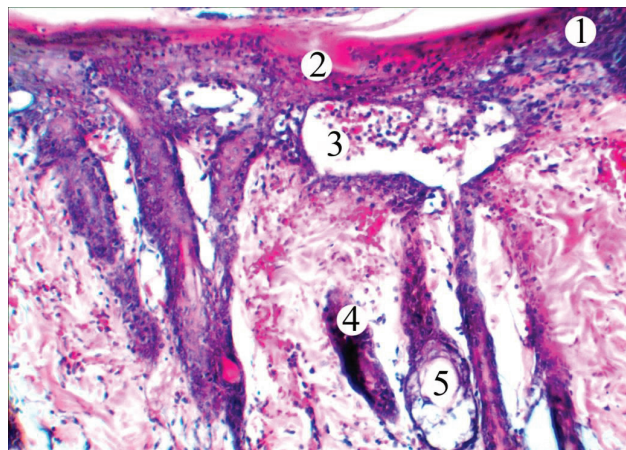


Рис. 1. Гістологічна картина шкіри тварини при експериментальному контактному нікелевому дерматиті. Центральна ділянка ураженої шкіри. Деструкція та інфільтрація епідермісу (1), ділянки детриту (2), порожнини з форменими елементами (3), ушкоджені корені волосся (4) та сальна залоза (5). Забарвлення гематоксилином та еозином. x 100.

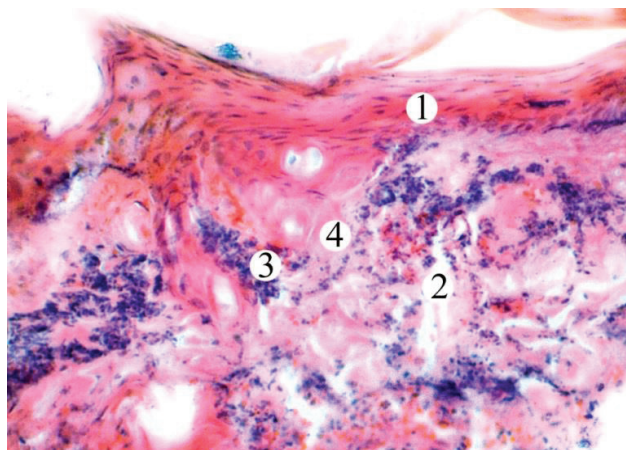


Рис. 2. Мікроскопічний стан епідермісу та структур дерми шкіри тварини при експериментальному дерматиті за умов застосування ПЕГ-СОД. Ділянка ушкодженого епідермісу (1) та дерми (2), лейкоцитарна інфільтрація (3), деструкція міжклітинної речовини (4). Забарвлення гематоксилином та еозином. x 100

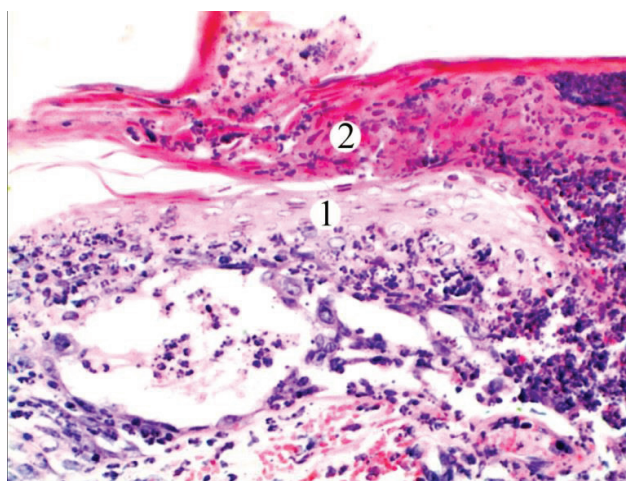


Рис. 3. Мікроскопічний стан епідермісу та структур дерми шкіри тварини при експериментальному дерматиті за умов застосування ПЕГ-СОД. Епітеліальний пласт (1), що розташований під ділянкою детриту (2). Забарвлення гематоксилином та еозином. x 100.

виявляється новоутворений пласт епітеліоцитів, у якому наявне диференціювання шарів (рис. 4), на відміну від тварин, які отримували звичайну форму ПЕГ-СОД.

Репаративна регенерація епідермісу відбувається як за рахунок крайової епітелізації, так і за рахунок придатків шкіри. Досить широкий пласт епідермоцитів підростає під кіркою, сприяє закриттю дефекту. Спостерігається активне формування епідермального шару завдяки епітеліоцитам коренів волосся (рис. 5).

У сосочковому шарі дерми є багато фіброblastів, синтетична діяльність яких забезпечує формування пухкої сполучної тканини. У її складі спостерігаються розширені, кровонаповнені гемокапіляри, наявний периваскулярний набряк. У сітчастому шарі дерми відмічається помірний набряк міжклітинної речовини (див. рис. 4, 5).

У периферійних ділянках дефекту за умов даної корекції, епідермальний пласт подібний був до шкіри тварин інтактною групи (рис. 6). У поверхневих шарах дерми спостерігалось часткове відшарування рогових лусочок.



Рис. 4. Мікроскопічний стан епідермісу та структур дерми центральної ділянки шкіри тварини групи КД + нано-СОД. Епітеліальний пласт (1), що формується під кіркою (2), сосочковий шар дерми з фіброblastами (3), корінь волосся (4). Забарвлення гематоксилином та еозином. x 100.

Таким чином, застосування ПЕГ-СОД, інкапсульованої у хітозанові наночастинки, має ряд переваг порівняно із застосуванням звичайної вільної її форми при експериментальному контактному нікелевому дерматитові. Перш за все наноформа СОД забезпечує більш активну та якісну репарацію ушкоджених структур шкіри, на що вказує наявність диференціації шарів у новоутвореному під некротизованою кіркою епітеліальному пластові. Також значно менше виражені прояви вогнищевої запальної реакції у дермі. У сосочковому шарі дерми наявна велика кількість фіброblastів, що забезпечує формування пухкої сполучної тканини. У її складі розширені та кровонаповнені новостворені гемокапіляри.

ВИСНОВКИ 1. Застосування протягом 12 днів 5 % нікелю сульфату призводить до формування виражених ознак контактного нікелевого дерматиту та ушкодження структур шкіри у досліджуваних тварин.

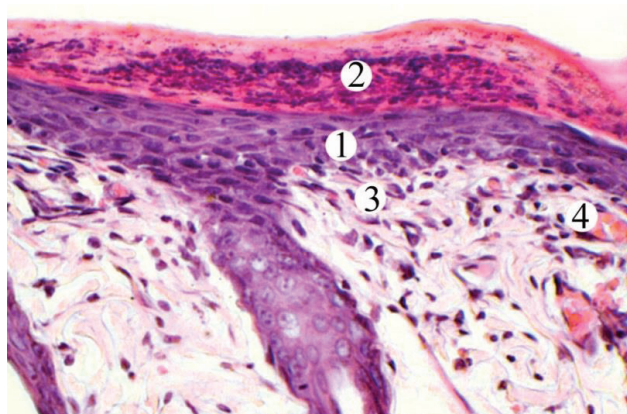


Рис. 5. Мікроскопічний стан епідермісу та структур дерми центральної ділянки шкіри тварини групи КД + нано-СОД. Епітеліальний пласт (1), що формується під кіркою (2), сосочковий шар дерми з фіброblastами (3), кровоносний капіляр (4). Забарвлення гематоксилином та еозином. x 200

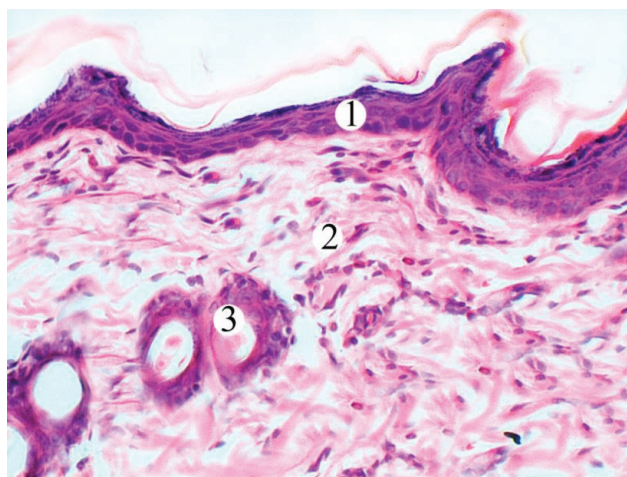


Рис. 6. Мікроскопічна організація епідермісу і дерми з придатками. Шкіра тварини групи КД + нано-СОД. Епідерміс (1), дерма (2), фрагмент кореня волосся (3). Забарвлення гематоксилином та еозином. x 200.

2. Аплікація вільної форми пегільованої супероксиддисмутази на уражені ділянки шкіри не призводить до вираженого покращення її стану. Все ще спостерігаються ділянки глибокої деструкції епідермального пласта, сосочкового і сітчастого шарів дерми та її придатків. Відмічається крайова епітелізація, пласт клітин підростає під ушкоджений епідерміс та сприяє закриттю дефекту.

3. Застосування пегільованої супероксиддисмутази, інкапсульованої у хітозанові наночастинки (наноформи) має ряд переваг порівняно із застосуванням звичайної вільної форми. Спостерігається більш активна та якісна репарація ушкоджених структур шкіри з диференціацією шарів у новоутвореному епітеліальному пластові. Зменшуються ознаки запальної реакції у дермі.

4. Застосування наноінкапсульованої форми препаратів з антиоксидними властивостями є перспективним напрямом для подальшого вивчення та впровадження у клінічну практику лікування дерматитів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Мочульська О. М. Поширеність atopічного дерматиту в дітей, особливості етіології та патогенезу на сучасному етапі / О. М. Мочульська // Актуальні питання педіатрії, акушерства та гінекології. – 2015. – № 1. – С. 94–98.
2. Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects / M. Peiser, T. Tralau, J. Heidler [et al.] // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2012. – Vol. 69, Issue 5. – P. 763–781.
3. Nutten S. Atopic dermatitis: global epidemiology and risk factors / S. Nutten // Annals of Nutrition and Metabolism. – 2015. – No. 66 (Suppl. 1). – P. 8–16.
4. Jomova K. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease / K. Jomova, M. Valko // Toxicology. – 2011. – Vol. 283, Issue 2. – P. 65–87.
5. Метаболические изменения биохимических показателей на местном и системном уровнях у пациентов с аллергическими заболеваниями / Е. А. Алексеенко, К. А. Попов, И. М. Быков [и др.] // Аллергология и иммунология – 2016. – Т. 17, № 2. – С. 93–97.
6. Ji H. Oxidative stress in atopic dermatitis / H. Ji, X. K. Li // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2016. – No. 6. – 8 p.
7. Kubesy A. A. Altered blood oxidative stress biomarkers in association with canine pyoderma and allergic contact dermatitis / A. A. Kubesy, N. Y. Salem, A. H. Jaheen // Comparative Clinical Pathology. – 2017. – Vol. 26, Issue 3. – P. 643–646.
8. Атопический дерматит у детей: оптимизация противозудной терапии // Т. Р. Уманец, В. Ф. Лапшин, Л. М. Тжертж [и др.] // Перинатология и педиатрия. – 2013. – № 3. – С. 43–47.
9. Современные подходы к наружной терапии больных витилиго / Л. А. Юсупова, Е. И. Юнусова, З. Ш. Гараева [и др.] // ПМ. – 2014. – № 8 (84). – С. 24–26.
10. Garg T. Comprehensive review on additives of topical dosage forms for drug delivery / T. Garg, G. Rath, A. K. Goyal // Drug delivery. – 2015. – Vol. 22, Issue 8. – P. 969–987.
11. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery / R. Goyal, L. K. Macri, H. M. Kaplan [et al.] // Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society. – 2016. – No. 240. – P. 77–92.
12. Self-assembled polymeric nanoparticles for percutaneous co-delivery of hydrocortisone/hydroxytyrosol: an ex vivo and in vivo study using an NC/Nga mouse model / Z. Hussain, H. Katas, M. C. Mohd Amin [et al.] // Int. J. Pharm. – 2013. – Vol. 444, Issue 1–2. – P. 109–119.

Роботу виконано в рамках НДР 0112U000542 "Біохімічні механізми токсичності наночастинок різної природи та інших антропогенних і біогенних токсикантів і біологічних систем" та 0116U003353 "Біохімічні механізми порушень метаболізму за умов надходження до організму токсикантів різного генезу".

Отримано 10.07.17

©I. I. Khudan-Tsilo, M. M. Korda

I. Horbachevsky Ternopil State Medical University

NANO-CAPSULATED SUPEROXIDE DISMUTASE AS A PROSPECTIVE METHOD OF CONTACT DERMATITIS TREATMENT

Summary. Significant prevalence of dermatitis and its frequent exacerbations make the search of new treatment methods extremely urgent. It is known that oxidative stress is an integral part of the pathogenesis of various types of dermatitis. Considering this, use of substances and medications with antioxidant properties is quite promising. Nano-carries have been increasingly used in dermatology recent years to improve the bioavailability of drugs and facilitate their penetration through the *stratum corneum*.

The aim of the study – to learn the structural reorganization of skin at experimental contact nickel dermatitis and its correction with drugs of superoxide dismutase (SOD) in free and nano-capsulated forms.

Materials and Methods. Experiment was carried out on 35 white inbred rats, which were divided into 4 groups. Group 1 – intact rats; group 2 – rats with contact nickel dermatitis (CD); group 3 – rats which got free form of SOD (CD + SOD); group 4 – group which got nano-capsulated form of SOD (CD + nano-SOD). Polymeric chitosan nanoparticles with encapsulated SOD were prepared by method of Hussain Z. et al. (2013). SOD preparations were applied 2 times per day during 7 days. The rats were euthanized at the 20th day of the experiment in accordance to all bioethical principles. Histological examination of skin stripes was performed by routine methods.

Results and Discussion. Histological examinations of the rat skin with CD showed signs of the most prominent destructive changes at the center of lesion. The epidermis destruction and areas of necrosis were observed. Hair roots and follicles, sebaceous glands were destructed. Damage of nuclei and cytoplasm of keratinocytes and fibroblasts was observed and signs of inflammation in derma. SOD in free form did not produced significant changes of skin structure. Application of nano-SOD promoted activation of regeneration processes. Skin defects at central area were covered. Under it the formation of new epithelia cell was observed. The differentiation of epithelium layers was seen. Signs of inflammation in derma were less visible.

Conclusions. Application of nano-encapsulated form of superoxide dismutase was more efficient for improving of the skin structure reorganization at contact nickel dermatitis, compared to use of its free form. Reparation of skin was more active with differentiation of epithelium layers and decreasing of inflammation signs. Nanotechnologies use to facilitate the antioxidant drugs penetration into damaged skin is the prospective direction of further study and clinical implementation.

Key words: structure changes; skin; dermatitis; nickel; superoxide dismutase; nano-capsulated form.

©И. И. Худан-Цильо, М. М. Корда

ГВУЗ "Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского"

НАНОФОРМА ПРЕПАРАТА СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ КОНТАКТНОГО ДЕРМАТИТА

Резюме. Значительная распространённость дерматитов и их частые обострения актуализируют поиск новых методов лечения. Оксидативный стресс является неотъемлемой частью патогенеза дерматитов, учитывая это применение субстанций и лекарств с антиоксидантными свойствами вполне оправдано и перспективно. В последнее время в дерматологии все чаще используют наночастицы для повышения биодоступности и всасываемости препаратов.

Цель исследования – изучить на микроскопическом уровне особенности регенерации кожи при коррекции экспериментального контактного никелевого дерматита (КД) препаратами супероксиддисмутазы (СОД) в свободной форме и виде наночастиц.

Материалы и методы. Эксперимент был проведен на 35 половозрелых крысах-самцах, содержащихся в стандартных условиях вивария. Животные методом слепой выборки были разделены на 4 подопытные группы: первая – интактные; вторая (n=10) – животные с экспериментальным контактным никелевым дерматитом (КД); третья (n=10) – животные с КД, получавшие в качестве коррекции СОД (КД + СОД); четвертая (n=10) – животные с КД, получавшие в качестве коррекции инкапсулированные наночастицы СОД (КД + нано-СОД). Полимерные хитозановые наночастицы получали по методике Z. Hussain et al. (2013). Препараты коррекции наносили два раза в день на протяжении 7 дней. Подопытных животных выводили из эксперимента на 20 день согласно всем биоэтическим правилам. Гистологическое исследование кожи проводили по общепринятым методикам.

Результаты исследований и их обсуждение. На микроскопическом уровне установлено, что при КД наибольшие изменения структурных элементов в центральных участках кожи, где наблюдается глубокая деструкция, значительное повреждение эпидермиса, очаговые язвенные поражения. Наблюдаются изменения ядер и цитоплазмы кератиноцитов, фибробластов, деструкция волокон соединительной ткани. Применение свободной формы СОД не вызывало значительного улучшения. При аппликации наноформы мы наблюдали активацию процессов регенерации. На центральном участке пораженной кожи гистологически фиксировали закрытие дефектов. Формировался новый эпителиальный шар с дифференциацией слоев. Уменьшались признаки воспаления в дерме.

Выводы. Применение наноинкапсулированной формы супероксиддисмутазы превышает по своей эффективности применение обычной формы препарата при контактном никелевом дерматите. Гистологическая картина подтверждает более стойкий и выраженный процесс обновления и регенерации структурных элементов кожи. Наноформы лекарственных антиоксидантных препаратов для лечения контактных дерматитов являются перспективным направлением для последующего изучения и внедрения в клиническую практику.

Ключевые слова: структурные изменения; кожа; дерматит; никель; супероксиддисмутазы; наноинкапсулированная форма.