

УДК 615.276:612.017.1:616.5-001.15-092.9

Гринь В.В., Звягинцева Т.В.

## ВЛИЯНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ С ФОТОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТЬЮ НА УРОВЕНЬ ИНТЕРЛЕЙКИНА-12 И ИНТЕРЛЕЙКИНА-13 В КРОВИ ПРИ ЛОКАЛЬНОМ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОМ ОБЛУЧЕНИИ КОЖИ МОРСКИХ СВИНОК В ПОСТЭРИТЕМНЫЙ ПЕРИОД

Харьковский национальный медицинский университет

*Изучено влияние лекарственных средств с фотозащитными эффектами «Мазь тиотриазолина 2%», «Мазь метилурациловая 10%», «Альтан», «Витамин А» на уровень интерлейкина-12 и интерлейкина-13 в сыворотке крови морских свинок в постэритемный период УФО кожи. Установлено, что локальное УФО кожи нарушает клеточно-опосредованное и гуморальное звенья иммунитета, что подтверждается снижением уровня интерлейкина-12 и интерлейкина-13 после исчезновения эритемы, а затем резким повышением на 14 сутки. Концентрация интерлейкина-12 и интерлейкина-13 не достигает физиологических значений даже в отдаленный постэритемный срок (28 суток). Все исследуемые препараты в той или иной степени влияют на нарушенные в результате УФО клеточные и гуморальные механизмы иммунитета. Так, «Мазь метилурациловая 10%» стимулирует клеточный иммунитет (интерлейкин-12) не влияя на гуморальный (интерлейкин-13). Препараты «Альтан» и «Витамин А», напротив, стимулируют гуморальные механизмы иммунологической реактивности, незначительно влияя на клеточные. Лишь «Мазь тиотриазолина 2%» стимулирует как клеточные, так и гуморальные механизмы иммунного ответа.*

Ключевые слова: ультрафиолетовое облучение, интерлейкин-12, интерлейкин-13, тиотриазолин, метилурацил, альтан, витамин А.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета МЗ Украины «Создание, исследование и патогенетическое обоснование применения новых комбинированных лекарственных средств и лекарственных средств политропного действия» (№ государственной регистрации 0109U001748) и «Механизмы и фармакологическая коррекция УФ-индуцированных повреждений кожи» (№ государственной регистрации 0113U002281).*

### Актуальность

Недостаточная защита от избытка ультрафиолетового облучения (УФО) приводит к тяжелым отдаленным последствиям – канцерогенезу, фотостарению, фотосенсибилизации, катаракте и др. [1]. По данным ВОЗ за год из-за чрезмерного воздействия УФО в результате инвалидности теряется примерно 1,5 миллиона лет жизни и происходит 60 000 случаев преждевременной смерти. От 50% до 90% раковых заболеваний кожи вызваны воздействием УФО [2]. Большинство негативных эффектов связывают с влиянием на иммунитет.

Поэтому поиск новых фотозащитных средств, обладающих иммунопротекторными свойствами, приобретает особую актуальность в современной фармакологии.

В последние годы показано, что интерлейкин-12 (IL-12) является ключевым цитокином для усиления клеточно-опосредованного иммунного ответа в коже и инициации эффективной противомикробной защиты в отношении вирусов, бактерий и грибов [3]. Интерлейкин-13 (IL-13) – ключевой цитокин, ответственный за гуморальный ответ и способный угнетать функции макрофагов, образуется в Т-клетках, нейтрофилах и некоторых неиммунных клетках. IL-13 относится к супрессорным факторам, экспрессируется в здоровой коже и влияет на кератиноциты [4]. Однако, влияние УФО на IL-12 и IL-13, особенно в отдаленный постэритемный период, не установлено.

Мы предположили, что лекарственные средства с фотопротекторной активностью «Мазь

тиотриазолина 2%», «Мазь метилурациловая 10%», «Альтан» и «Витамин А» могут влиять на содержание IL-12 и IL-13 сыворотки крови, в том числе и в отдаленные после УФО сроки.

### Цель работы

Изучение влияния лекарственных средств с фотозащитными эффектами «Мазь тиотриазолина 2%», «Мазь метилурациловая 10%», «Альтан», «Витамин А» на уровень IL-12 и IL-13 сыворотки крови морских свинок в постэритемный период УФО кожи.

### Материалы и методы исследования

Исследования проводились на 96 морских свинок-альбиносах массой 650-800 г, распределенных на 6 групп: первая – интактные (n=6); вторая – животные, подвергшиеся локальному УФО (контроль, без лечения) (n=18); животным третьей, четвертой, пятой и шестой групп в лечебно-профилактическом режиме назначали препараты «Мазь тиотриазолина 2%» (n=18), «Мазь метилурациловая 10%» (n=18), «Альтан» (n=18) и «Витамин А» (n=18) соответственно.

Фотопротекторную активность лекарственных средств изучали на модели острого эксудативного воспаления – УФ-эритемы [5]. Эритему вызывали с помощью ртутно-кварцевой лампы ОКН-11М в дозе 1 минимальная эритемная доза (МЭД). Все препараты назначались в лечебно-профилактическом режиме за 40 мин до, через 2 часа после облучения и ежедневно до исчезновения эритемы. «Мазь тиотриазолина 2%» и «Мазь метилурациловая 10%» наносились на поврежденную поверхность кожи, «Аль-

тан» и «Витамин А» вводились перорально. Животных выводили из эксперимента сразу после исчезновения эритемы, на 14-е и 28-е сутки путем декапитации под анестезией с использованием тиопентала-натрия в соответствии с Общими этическими принципами опытов на животных (Украина, 2001) и Уставом Украинской ассоциации по биоэтике и нормами GLP (1992). Уровень IL-12 и IL-13 в периферической крови определяли иммуноферментным методом [6] с использованием коммерческих тест-систем согласно прилагаемой к набору инструкции на иммуноферментном анализаторе «Labline-90» (Австрия). Полученные данные обрабатывались статистически методом вариационной статистики, при сравнении выборок – с помощью критерия Стьюдента [7].

### Результаты исследования и их обсуждение

По результатам нашего исследования у животных, подвергшихся локальному УФО, после исчезновения эритемы (10 суток) содержание IL-12 и IL-13 в сыворотке крови было пониженным на 39% и 25% соответственно. На 14 сутки уровень IL-12 и IL-13 резко повышался (на 41% и 34% выше нормы соответственно), на 28 сутки оставался выше на 35% и 22% соответственно по сравнению с интактными животными. Таким образом, при локальном УФО кожи наблюдалась однотипная закономерность изменений уровня IL-12 и IL-13: после исчезновения эритемы (10 суток) концентрация обоих цитокинов была ниже нормы, на 14 сутки – резко возрастала, 28 сутки – снижалась, но оставалась выше

нормы, что свидетельствует о нарушении клеточно-опосредованного и гуморального звеньев иммунитета. Одними из клеток продуцентов IL-12 являются клетки Лангерганса (обладают антигенпрезентирующей функцией и осуществляют иммунный надзор). Их повреждение ультрафиолетовыми лучами приводит к нарушению механизмов иммунологической защиты кожи. Количество клеток Лангерганса уменьшается, снижается также их функциональная активность. В результате повышается риск развития таких злокачественных новообразований, как меланома, базалиома, плоскоклеточный ороговевающий рак на подверженных воздействию солнечных лучей участках кожи [8]. Избыток УФО вызывает фотосенсибилизацию, что приводит к нарушению функций макрофагов, эозинофилов и тучных клеток, и следовательно, приводит к угнетению синтеза IL-13.

Под влиянием препарата «Мазь тиотриазолина 2%» эритемная реакция исчезала на 8 сутки. В это время уровень IL-12 не отличался от нормы. Некоторое повышение содержания цитокина по сравнению с интактными животными отмечалось на 14 сутки, но было ниже, чем в группе без лечения на 31%. На 28 сутки уровень IL-12 в крови находился в пределах физиологических колебаний (табл. 1).

Концентрация IL-13 была повышена по сравнению с группой без лечения: после исчезновения эритемной реакции – на 42%, на 14 сутки – на 23%, на 28 сутки – на 16% соответственно (табл. 2).

Таблица 1  
Влияние лекарственных средств с фотопротекторной активностью на уровень интерлейкина-12 (пг/мл) в сыворотке крови морских свинок в постэритемный период локального УФО (M±m)

Группы	Сроки наблюдений (сутки)		
	Время исчезновения эритемы	14-е	28-е
Интактные животные		19,97 ± 2,0	
Без лечения (контроль)	12,16 ± 1,96 *	33,69 ± 1,78 *	30,82 ± 1,35 *
Мазь тиотриазолина	19,14 ± 1,2 #	23,03 ± 1,96 * #	20,09 ± 1,56 #
Мазь метилурациловая	17,95 ± 1,08 #	23,62 ± 1,51 * #	21,33 ± 2,99 #
Альтан	17,29 ± 1,29 * #	26,9 ± 1,82 * #	25,21 ± 2,7 * #
Витамин А	17,64 ± 1,32 * #	24,45 ± 1,6 * #	23,88 ± 1,49 * #

Примечания: 1. \* -  $p < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с интактными животными  
# -  $p < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с группой без лечения

Таблица 2  
Влияние лекарственных средств с фотопротекторной активностью на уровень интерлейкина-13 (пг/мл) в сыворотке крови морских свинок в постэритемный период локального УФО (M±m)

Группы	Сроки наблюдений (сутки)		
	Время исчезновения эритемы	14-е	28-е
Интактные животные		43,8 ± 3,98	
Без лечения (контроль)	32,59 ± 3,91 *	66,24 ± 6,81 *	55,91 ± 4,67 *
Мазь тиотриазолина	56,17 ± 3,8 * #	85,84 ± 7,83 * #	66,51 ± 4,61 * #
Мазь метилурациловая	48,78 ± 8,13 #	68,51 ± 6,75 *	61,95 ± 4,05 *
Альтан	51,46 ± 6,91 * #	67,25 ± 4,74 *	67,4 ± 6,02 * #
Витамин А	55,98 ± 3,14 * #	69,56 ± 3,25 * #	65,11 ± 6,9 * #

Примечания: 1. \* -  $p < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с интактными животными  
# -  $p < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с группой без лечения

При лечебно-профилактическом использовании лекарственного средства «Мазь метилурациловая 10%» направленность изменений концентрации IL-12 не отличалась от выявленной

при применении препарата «Мазь тиотриазолина 2%»: уровень IL-12 был выше по сравнению с контролем после исчезновения эритемы (9 сутки) на 32% и достоверно не изменялся по

сравнению с интактными животными. На 14 сутки содержание IL-12 было больше на 14% по сравнению с нормой и на 30% меньше, чем в группе без лечения. На 28 сутки наблюдалась нормализация уровня IL-12 в сыворотке крови.

Концентрация IL-13 (9 сутки) достоверно не отличалась от нормы, но была выше на 33% по сравнению с группой без лечения. На 14 и 28 сутки содержание IL-13 достоверно не изменялось по сравнению с контролем.

Под воздействием препарата «Альтан» в ранний постэритемный период (8 сутки) уровень IL-12 был больше на 30%, чем в группе без лечения. На 14 и 28 сутки наблюдалось постепенное снижение изучаемого показателя на 20% и 18% соответственно по сравнению с контрольной группой. При лечебно-профилактическом применении лекарственного средства «Витамин А» кинетика изменений содержания IL-12 аналогична обнаруженной в группе с применением альтана: на 8 сутки (время исчезновения эритемы) концентрация IL-12 была на 31% выше, чем в группе без лечения; на 14 и 28 сутки – меньше на 27% и на 23% соответственно.

Направленность изменений содержания IL-13 в сыворотке крови при использовании препаратов «Альтан» и «Витамин А» не отличалась от выявленной при применении мази тиотриазолина, но была менее выраженной. Под влиянием альтана после исчезновения эритемной реакции (8 сутки) уровень IL-13 был больше контроля на 37%, на 28 сутки – на 17%. При лечебно-профилактическом использовании витамина А концентрация IL-13 была повышена по сравнению с контролем – на 42% (8 сутки) и на 14% (28 сутки).

Из представленных данных следует, что все исследуемые препараты в той или иной степени влияют на нарушенные в результате УФО клеточные и гуморальные механизмы иммунитета. Так, мазь метилурациловая стимулирует клеточный иммунитет, не влияя на гуморальный.

#### Реферат

ВПЛИВ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ З ФОТОПРОТЕКТОРНОЮ АКТИВНІСТЮ НА РІВЕНЬ ІНТЕРЛЕЙКІНУ-12 ТА ІНТЕРЛЕЙКІНУ-13 В КРОВІ ПРИ ЛОКАЛЬНОМУ УЛЬТРАФІОЛЕТОВОМУ ОПРОМІНЕННІ ШКІРИ МОРСЬКИХ СВИНОК В ПОСТЕРИТЕМНИЙ ПЕРІОД. Гринь В.В., Звягінцева Т.В.

Ключові слова: ультрафіолетове опромінення, інтерлейкін-12, інтерлейкін-13, тиотриазолін, метилурацил, альтан, вітамін А.

Вивчено вплив лікарських засобів з фотозахисними ефектами «Мазь тиотриазоліну 2%», «Мазь метилурацилова 10%», «Альтан», «Вітамін А» на рівень інтерлейкіну-12 та інтерлейкіну-13 в сироватці крові морських свинок у постерітемний період УФО шкіри. Встановлено, що локальне УФО шкіри порушує клітинно-опосередковану та гуморальну ланки імунітету, що підтверджується зниженням рівня інтерлейкіну-12 та інтерлейкіну-13 після зникнення еритеми, а потім різким підвищенням на 14 добу. Концентрація інтерлейкіну-12 та інтерлейкіну-13 не досягає фізіологічних значень навіть у віддалений постерітемний термін (28 діб). Всі досліджувані препарати впливають на порушені в результаті УФО клітинні та гуморальні механізми імунітету, але різною мірою. Так, «Мазь метилурацилова 10%» стимулює клітинний імунітет, не впливаючи на гуморальний. Препарати «Альтан» та «Вітамін А», навпаки, стимулюють гуморальні механізми імунітету, незначно впливаючи на клітинні. Лише «Мазь тиотриазоліну 2%» стимулює як клітинні, так і гуморальні механізми імунної відповіді.

Препараты «Альтан» и «Витамин А», напротив, стимулируют гуморальные механизмы иммунологической реактивности, незначительно влияя на клеточные. Лишь мазь тиотриазолина стимулирует как клеточные, так и гуморальные механизмы иммунного ответа.

#### Выводы

1. Локальное УФО нарушает клеточное и гуморальное звенья иммунитета, что подтверждается снижением уровня IL-12 и IL-13 после исчезновения эритемы, а затем резким повышением на 14 сутки. Концентрация IL-12 и IL-13 не достигает физиологических значений даже в отдаленный постэритемный период (28 суток).

2. «Мазь тиотриазолина 2%» влияет на содержание провоспалительного IL-12 и противовоспалительного IL-13 в крови. Применение препарата «Мазь метилурациловая 10%» нормализует уровень только IL-12 и почти не влияет на концентрацию IL-13. Препараты «Альтан» и «Витамин А» оказывают более выраженное влияние на содержание IL-13, чем на уровень IL-12.

#### Литература

1. Акимов В.Г. Биологические эффекты ультрафиолетового облучения кожи / В.Г. Акимов // Вестник дерматологии и венерологии. – 2008. – № 3. – С. 81-84.
2. Ультрафиолетовое излучение и здоровье людей // Информационный бюллетень № 305 ВОЗ, декабрь 2009 г. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs305/ru/>
3. Интерлейкин-12. Значение и функции интерлейкина-12 при воспалении // Медицинский портал Медунивер [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://meduniver.com/Medical/pulmonologia/105.html>
4. Белова О.В. Роль цитокинов в иммунологической функции кожи / О.В. Белова, В.Я. Арион, В.И. Сергиенко // Иммунология, аллергология, инфектология. – 2008. – №1. – С. 41-55.
5. Стефанов А.В. Биоскрининг. Лекарственные средства / Стефанов А.В. – К.: Авиценна, 1998. – 189 с.
6. Сенников С.В. Методы определения цитокинов / С.В. Сенников, А.Н. Силков // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 22-27.
7. Гланц С. Медико-биологическая статистика / Гланц С. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
8. Rosmarin D. The potential of interleukin-12 inhibition in the treatment of psoriasis / D. Rosmarin, B.E. Strober // J Drugs Dermatol. – 2005. – №4. – P. 18-25.

### Summary

EFFECT OF PHOTOPROTECTIVELY ACTIVE THERAPEUTICAL AGENTS ON BLOOD INTERLEUKIN-12 AND INTERLEUKIN-13 OF GUINEA PIGS DURING POST-ERYTHEMATOUS PERIOD UNDER EXPOSED TO LOCAL ULTRAVIOLET SKIN IRRADIATION

Grin V.V., Zvyagintseva T. V.

Key words: ultraviolet radiation, interleukin-12, interleukin-13, Thiotriazoline, Methyluracilum, Altan, Vitamin A.

**Introduction.** The majority of negative effects of excessive ultraviolet irradiation (UVI) have been associated with an impact on the immunity. It has been shown recently that interleukin-12 (IL-12) is the key cytokine for the increase in cell-mediated immune response in the skin and initiation of efficient anti-inflammatory protection. Interleukin-13 (IL-13) is the key cytokine for the humoral immunity regulation, belongs to suppressive factors, is expressed in healthy skin and has an effect on keratinocytes.

The aim of this work was to study the impact of photoprotectively active therapeutic agents "Ointment tiotriazolini 2%", "Ointment methyluracil 10%", "Altan", "Vitamin A" on the level of IL-12 and IL-13 in blood serum of guinea pigs during post-erythematous period of skin UVI.

**Materials and Methods.** The studies involved 96 albino guinea pigs, distributed into 6 groups: 1 – intact (n=6); 2 – animals, exposed to local UVR (control, without treatment, n=18); the animals of the 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> groups were given therapeutical agents "Ointment tiotriazolini 2%" (n=18), "Ointment methyluracil 10%" (n=18), "Altan" (n=18), "Vitamin A" (n=18) respectively. The radiation was exerted in the dosage of 1 MED (minimal erythemal dose). All the agents were administered in medical and preventive mode 40 minutes before and 2 hours after the radiation and every day up to the elimination of erythema. "Ointment tiotriazolini 2%" and "Ointment methyluracil 10%" were administered onto the damaged skin, "Altan" and "Vitamin A" were administered perorally. The levels of IL-12 and IL-13 in peripheral blood were determined by immunoenzyme method during early (after elimination of erythema) and late (days 14 and 28) posterythematous term.

**Results.** After elimination of erythema (day 10) the amount of IL-12 and IL-13 in blood serum of guinea pigs reduced by 39% and 25%, respectively. At the 14<sup>th</sup> day the levels of IL-12 and IL-13 abruptly increased (by 41% and 34% above the norm), at the 28<sup>th</sup> day it remained higher by 35% and 22% respectively in comparison with intact animals. The administration of "Ointment tiotriazolini 2%" agent resulted in elimination of erythematous reaction by the 8<sup>th</sup> day. At this time the level of IL-12 was in normal limits. A slight increase in the amount of cytokine in comparison with intact animals was observed at the 14<sup>th</sup> day, but it was lower than in the group which did not receive treatment by 31%. At the 28<sup>th</sup> day the level of IL-12 in blood was in the limits of physiologic fluctuations. The concentration of IL-13 was higher than in the group without treatment: after elimination of erythematous reaction – by 42%, at the 14<sup>th</sup> day – by 23%, at the 28<sup>th</sup> day – by 16% respectively. The direction of changes in the level of IL-12 under the influence of "Ointment methyluracil 10%" did not differ from the observed one when using "Ointment tiotriazolini 2%". The concentration of IL-13 (day 9) did not show any significant changes from the norm but it was higher by 33% in comparison with the group which did not receive treatment. During the 14<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup> day the amount of IL-13 did not change significantly in comparison with the control group. After administration of agents "Altan" and "Vitamin A" at early post-erythematous period (day 8) the level of IL-12 was higher on average by 30,5% than in the group without treatment. At the 14<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup> day there was observed a gradual reduction, other than normalization of the index under investigation. The direction of changes in the amount of IL-13 in blood serum when administering therapeutical agents "Altan" and "Vitamin A" did not differ from the one which was observed in the case of "Ointment tiotriazolini 2%" but was less severely expressed.

**Conclusions:** 1. Exposure to local UVI affects cellular and humoral chains of immunity, which is confirmed by a reduction in the level of IL-12 and IL-13 after elimination of erythema and then by an abrupt increase at the 14<sup>th</sup> day. The concentration of IL-12 and IL-13 does not reach physiologic values even in the remote post-erythematous period (28 days).

2. "Ointment tiotriazolini 2%" effect on the content of proinflammatory IL-12 and anti-inflammatory IL-13 in blood. The use of the drug "Ointment methyluracil 10%" normalizes the level of IL-12 alone, and almost no effect on concentration of IL-13. "Altan" and "Vitamin A" have a more pronounced effect on the content of IL-13 than IL-12.