

УДК 616.5-008.6; 536.7

## СОЗДАНИЕ ЛИПОСОМНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИТИЛИГО

Т.С. СААТОВ\*, О.И. УМЕРОВ\*, Б.Т. СААТОВ\*\*, С.С. АРИФОВ\*

\*Институт биохимии Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент

\*\*Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр дерматологии и венерологии Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент, e-mail: [t.saatov@yandex.ru](mailto:t.saatov@yandex.ru)

**Аннотация:** работа посвящена исследованию основных патогенетических факторов витилиго – широко распространенного заболевания кожи человека и разработке, на основе полученных результатов, липосомного препарата для его терапии. Установлен высокий уровень окислительного стресса и изменение фосфолипидного состава кожи у больных витилиго. Липосомы приготовили из фосфолипидов и холестерина, полученных из мозга быка. В липосомы инкапсулировали ряд ингредиентов, играющих важное значение в патогенезе витилиго. Созданный липосомный препарат использовали местно для лечения витилиго путем нанесения на пораженные участки кожи больных в комбинации с ультрафиолетовым облучением. После трех курсов терапии репигментация с различной степенью выраженности зарегистрирована у 97% больных, что значительно выше по сравнению с традиционным методом лечения витилиго.

**Ключевые слова:** витилиго, липосомы, окислительный стресс, фосфолипиды.

## CREATION OF LIPOSOMAL MEDICINE FOR TREATMENT OF VITILIGO

T.S. SAATOV, O.I. UMEROV, B.T. SAATOV, S.S. ARIFOV

*Institute of Biochemistry, Uzbekistan Academy of Sciences, Tashkent*

*Republican Specialized Scientific-Practical Medical Center of Dermatology and Venereology, Uzbekistan Public Health Ministry e-mail: [t.saatov@yandex.ru](mailto:t.saatov@yandex.ru)*

**Abstract:** the work was initiated to study basic pathogenetic factors of vitiligo, a widely spread human's skin disease for development of liposomal medicine to treat patients with the disease on the basis of the findings in the study. In patients with vitiligo high level of oxidative stress and change in the skin phospholipid composition was established. Liposomes were prepared from phospholipids and cholesterol obtained from the bovine's brain. A number of ingredients playing a significant role in pathogenesis of vitiligo were encapsulated into the liposomes. The liposomal medicine was used topically for treatment of vitiligo by its application on the affected spots of the patients in combination with UV irradiation. Following three courses of therapy repigmentation with various degree of intensity was registered in 97% of patients to be significantly higher as compared with the conventional methods of vitiligo treatment.

**Key words:** vitiligo, liposomes, oxidative stress, phospholipids.

Витилиго является приобретенным, хронически протекающим дерматозом, характеризующимся появлением на коже белых пятен в результате резкого уменьшения или отсутствия меланоцитов, продуцирующих пигмент меланин. Витилиго относится к числу широко распространенных заболеваний человечества и его средняя распространенность среди популяции в мировом масштабе составляет 1-2% [5, 7]. В последние годы отмечается интенсивный рост числа больных витилиго, особенно среди детей, молодежи и лиц трудоспособного возраста, что значительно снижает качество жизни больных и придает этому дерматозу определенное социальное значение. Тем не менее, патогенез этого заболевания все еще остается не установленным и эффективные методы лечения отсутствуют. Относительно патогенеза витилиго можно отметить, что в настоящее время существует ряд гипотез не отрицающих друг друга. Среди них наиболее популярными и обоснованными являются генетическая, нейроэндокринная и аутоиммунная, а также теория, биохимических нарушений и окислительный стресс [1, 5, 6, 9].

Следует отметить, что структурно-метаболические исследования кожи, в частности, при витилиго практически не проведены. В литературе отсутствуют данные об исследовании фосфолипидов кожи человека, являющихся структурной основой мембран пигментных клеток. Именно, разрушение мембранных структур меланоцитов под влиянием различных воздействий, в том числе окислительного стресса считается одним из основных факторов патогенеза витилиго.

**Цель исследования** – изучение основных звеньев метаболических нарушений в коже при развитии витилиго и на основе полученных результатов создание липосомного препарата предназначенного для патогенетической терапии витилиго.

**Материалы и методы исследования.** Биохимические исследования проводились на биоптатах здоровой кожи и депигментированных участков кожи больных витилиго, а также в сыворотке крови больных.

Экстракцию общих липидов из биологических объектов и их очистку от нелипидных примесей проводили по методике Folch, с рекомендациями Кейтс [2] с использованием хлороформ – метаноловой смеси (2:1).

Очищенный общий липидный экстракт кожи использовали для определения суммарных фосфолипидов и их фракционного состава.

О количестве фосфолипидов и их фракций судили по содержанию фосфора в них по методике [10]. Фракционный состав фосфолипидов изучали с помощью тонкослойной хроматографии на силикагеле КСК. Выявленную каждую фракцию соскабливали из пластинки, затем их подвергали минерализации в присутствии концентрированной хлорной кислоты в алюминиевых блоках при температуре 200 °С. Образовавшееся неорганический фосфор определяли, по методике Vaskovsky et al. [10]. *Перекисное окисления липидов* (ПОЛ) в коже и сыворотке крови изучали по количеству его конечного продукта – *малонового диальдегида* (МДА) с использованием 2-тиобарбитуровой кислоты. [4] Активность каталазы в крови и гомогенате биоптата кожи определяли по методике Королук и др. [3] Липосомы были конструированы из фосфолипидов и холестерина (соотношение 7:1), изолированных из мозга быка общепринятым методом с помощью ультразвуковой обработки. В липосомы инкапсулированы тирозин, (0,01%) купир (препарат меди – 0,01%), селен (0,0005%) и  $\alpha$ -токоферол (0,05%). Полученный целевой продукт – липосомный препарат представляет собой молочную, слегка опалесцирующую вязкую эмульсию. На экспериментальных животных доказана абсолютная не токсичность созданного лекарственного препарата.

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с использованием пакета программ Statistica 6.0 Критический уровень значимости (p) при проверки статистических гипотез в данном исследовании принимали равным 0,05. Результаты представлены в формате  $M \pm m$ , где M-выборочное среднее, m(SEM)-ошибка среднего.

**Результаты и их обсуждение.** Нами в сравнительном аспекте исследован фосфолипидный состав кожи здоровых лиц и больных витилиго. Установлено значительное снижение содержания суммарных фосфолипидов в депигментированных участках кожи больных витилиго по сравнению с аналогичным показателем кожи здоровых лиц. Если содержание общих фосфолипидов в здоровой коже составляет 1324,4±57,9 мкг липидного фосфора на 1 грамм сухой навески ткани, то в пораженной части кожи больных оно было равно 1157,5±52,9 мкг P/1г сухой ткани. При изучении фракционного состава кожи в норме и при витилиго были выявлены определенные различия (табл. 1).

Таблица 1

**Фракционный состав фосфолипидов кожи человека в норме и при витилиго (%)**

| №  | Фракции фосфолипидов  | Здоровая кожа<br>(n=12) | Витилигинозная кожа  |                                  |
|----|-----------------------|-------------------------|----------------------|----------------------------------|
|    |                       |                         | До лечения<br>(n=42) | После липосомо терапии<br>(n=27) |
| 1. | Лизофосфатидилхолин   | 3,4±0,1                 | 5,3±0,2*             | 4,2±0,2                          |
| 2  | Сфингомиелин          | 20,6±0,9                | 18,2±0,8             | 19,3±0,8                         |
| 3  | Фосфатидилхолин       | 37,6±1,5                | 34,2±1,8             | 36,1±2,0                         |
| 4  | Фосфатидилсерин       | 3,3±0,1                 | 4,5±0,2              | 3,8±0,2                          |
| 5  | Фосфатидилинозитол    | 6,1±0,3                 | 7,9±0,4              | 6,5±0,4                          |
| 6  | Фосфатидилэтанолламин | 23,0±1,3                | 20,1±1,2             | 23,2±1,3                         |
| 7  | Кардиолипин           | 2,2±0,1                 | 4,6±0,2*             | 3,1±0,2                          |
| 8  | Фосфатидная кислота   | 3,7±0,1                 | 5,2±0,2*             | 3,6±0,2                          |

Примечание: \* –  $p < 0,05$  – достоверное изменение по сравнению с контролем.

В отличие от нормы в депигментированной части кожи больных витилиго наблюдалось увеличение содержания лизофосфатидилхолина и фосфатидной кислоты. В коже больных отмечается также увеличение содержания фосфатидилсерина, фосфатидилинозита и кардиолипина, тогда как содержание нейтральных фракций фосфолипидов – фосфатидилхолина, фосфатидилэтанолламина и сфингомиелина заметно снижалось. Как видно, фосфолипидный состав кожи подвергается значительному изменению при её витилигинозном поражении. Как указано выше, среди существующих гипотез о патогенезе витилиго наиболее распространенным является развитие окислительного стресса в организме больного. Однако, это гипотеза также остается окончательно не принятым из-за малочисленности проведенных исследований и отсутствия убедительных экспериментальных данных. Далее мы изучали состояние основных показателей окислительного стресса, т.е. интенсивность ПОЛ и активность фермента *антиокислительной системы* (АОС) – каталазы в коже и сыворотке крови больных витилиго (табл. 2, рис. 1 и 2).

Параметры окислительного стресса в сыворотке крови здоровых лиц и больных витилиго до и после лечения

| № | Исследуемая группа                     | Малоновый диальдегид (нмоль/мгбелка/мин). (n=16) | Активность каталазы (м/кат/л). (n=16) |
|---|--|--|---------------------------------------|
| 1 | Контроль                               | 1,6±0,1  | 60,1±1,6                              |
| 2 | Больные витилиго до лечения            | 2,6±0,2*   | 45,6±2,5                              |
| 3 | Больные витилиго после липосом-терапии | 1,7±0,1  | 55,4±2,1                              |

Примечание: \* –  $p < 0,05$  – достоверное изменение по сравнению с контролем

Результаты исследования показали, что у больных витилиго как в пораженном участке кожи, так и сыворотке крови происходит резкое увеличение уровня МДА и значительное снижение активности каталазы.

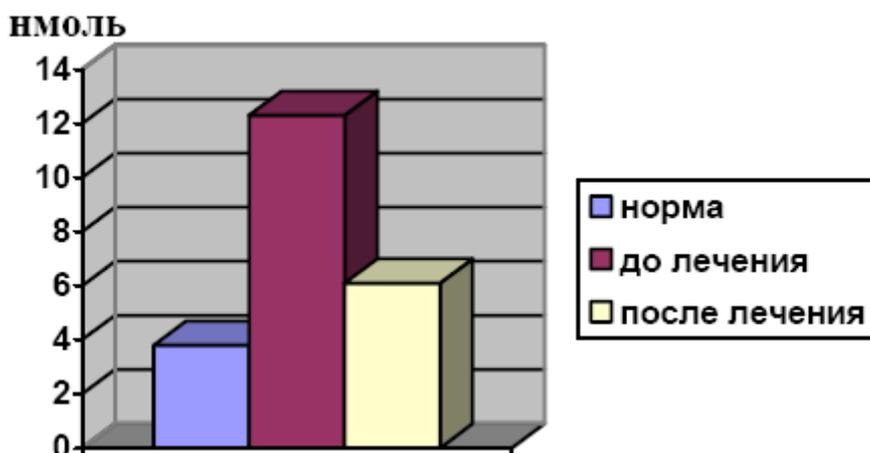


Рис. 1. Содержание МДА в коже здоровых лиц и больных витилиго. (нмоль/мг белка/мин)

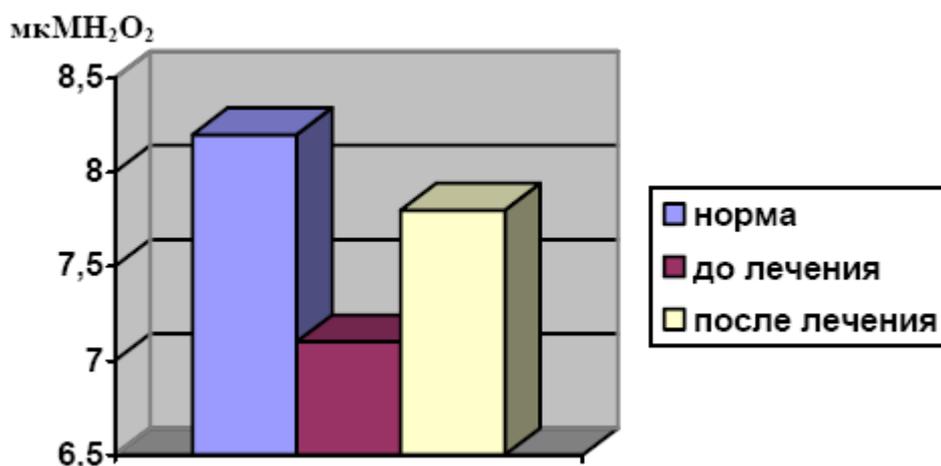


Рис. 2. Активность каталазы в коже здоровых лиц и больных витилиго. (мкмоль H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/мг белка/мин)

По сравнению с нормой, в депигментированной зоне кожи больных витилиго содержание МДА возрастает более чем в 3 раза, тогда как активность каталазы падает на 15%. Аналогично этому, в сыворотке крови больных уровень МДА повышается на 65%, а активность каталазы снижается в 1,32 раза чем в контроле. Таким образом результаты наших исследований подтверждают, что при витилиго происходит значительный дисбаланс в системе ПОЛ-АОС и развитие окислительного стресса в организме больных, что имеет особое значение в патогенезе данного дерматоза.

На основании результатов проведенных исследований нами разработан липосомный препарат, предназначенный для патогенетической терапии витилиго.

Созданный нами липосомный препарат был применен местно у 42 больных витилиго в сочетании с ультрафиолетовым облучением очага поражения. Липосомы наносили тонким слоем на депигментированные зоны кожи больных за один час до фотохимиотерапии 3 раза в неделю. Один курс терапии состоит из

15 сеансов, с интервалом между курсами 21-25 дней. Контрольную группу составляло 153 пациента, получавших принятую традиционную терапию, включающую в себя ультрафиолетовое облучение, но без липосом.

Общую оценку эффективности лечения больных витилиго традиционным способом и с использованием липосомного препарата проводили после трех курсов терапии.

По нашим данным, из 153 больных витилиго, получивших традиционный способ лечения, репигментация различной степени выраженности наблюдалась у 111 больных (73,1%). Среди них у 16 больных (10,6%) отмечалось клиническое излечение, у 50 (32,7%) – значительное улучшение, и у 45 (29,8%) – улучшение. У 36 больных (23,5%) отсутствовал эффект после проведенной терапии, а у 6 больных (3,8%) наступило ухудшение кожного процесса.

Местное применение липосомного препарата на фоне фотохимиотерапии у 42 больных витилиго дали следующие результаты: у 14 больных (33,3%) наступило клиническое выздоровление, у 17 (40,5%) – значительное улучшение и у 10 (23,8%) – улучшение, только у 1 больного (2,4%) не было эффекта лечения. В целом, процент репигментации составлял 97,6%, побочных эффектов не отмечалось.

Как видно из представленных данных, местное применение липосомного препарата показало высокую эффективность в терапии витилиго.

Улучшение клинической картины болезни и усиление репигментации пораженных участков кожи больных витилиго под влиянием липосомного препарата коррелирует с изменениями изученных нами биохимических показателей кожи. Как видно из данных табл.1. после липосомотерапии фракционный состав фосфолипидов депигментированных участков кожи больных витилиго изменяется в сторону нормальных значений. В частности отмечается заметное снижение содержания лизофосфатидилхолина и фосфатидной кислоты. Лечение витилиго липосомным препаратом оказывал также положительный эффект на показатели оксидативного стресса в сыворотке крови больных. Так, после такой терапии имело место снижение содержания МДА в крови больных на 34%, а активность каталазы при этом повышалась на 21%. (табл.2.).

Аналогично вышеуказанным данным, местное применение липосом в качестве лечебного препарата для патогенетической терапии витилиго привело к изменению в нормальную сторону показателей окислительного стресса в коже больных (рис.1 и 2). После липосомотерапии содержание МДА в пораженном участке кожи больных витилиго снижалось почти в 2 раза по сравнению с данными до лечения, а активность каталазы повышалась на 14%.

Таким образом, проведенное клиническое испытание у больных витилиго созданного в нашей лаборатории липосомного препарата убедительно доказывает, что этот препарат по терапевтической эффективности значительно превосходит другие способы лечения данного дерматоза. В результате лечения с использованием липосом у больных витилиго отмечается тенденция к снижению окислительного стресса и модификация фосфолипидного состава кожи в сторону нормализации. Изменение показателей окислительного стресса у больных витилиго с сторону нормализации при локальном применении липосом мы склонны объяснить эффектом антиоксидантных препаратов, так как в состав липосомного препарата был включен мощный антиоксидант –  $\alpha$ -токоферол и биоантиоксидант – селен. Фосфолипиды, составляющие липосомную мембрану также обладают антиокислительной способностью. Кроме того, липосомы обладающие свойством трансдермальной проницаемости, могут доставлять в глубокие слои кожи препараты способствующие созреванию незрелых, функционально не активных меланоцитов, расположенных вокруг волосяных фолликулов и миграции их в эпидермис [7,8]. Тирозин включенный в состав липосом являясь предшественником меланина может стимулировать биосинтез этого пигмента в коже. Можно полагать, что липосомы и инкапсулированные в них ингредиенты в совокупности способствуют усилению репигментации пораженных участков кожи при витилиго.

Таким образом, вышеописанные данные позволяют утверждать, что локальное использование липосом является эффективным лекарственным средством для лечения кожных заболеваний.

#### **Выводы:**

1. В коже больных витилиго отмечается интенсификация ПОЛ и подавление АОС, а также изменение фракционного состава фосфолипидов.
2. Разработан мультикомпонентный липосомный препарат местного применения, предназначенный для патогенетической терапии витилиго. Препарат показал высокую эффективность по сравнению с другими методами лечения витилиго и этот препарат рекомендуется для широкого использования в терапии данного дерматоза.

#### **Литература**

1. *Жаворонкова, Е.В.* Опыт применения элтамина в терапии витилиго /Е.В. Жаворонкова, М.А. Горностаева, И.М. Корсунская // Клин. Дерматол. Венерол.– 2009.– № 4.– С. 9–12.
2. *Кейтс, М.* Техника липидологии / М. Кейтс.– М.: Изд. Мир, 1975.– С. 74–75.
3. *Королюк, М.А.* Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова // Лабораторное дело.– 1988.– № 1.– С. 16–18.
4. *Стальная, И.Д.* Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты, Современные методы в биохимии (под ред. В.Н.Ореховича) / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили // Медици-

на.– 1977.– С. 66–68.

5. *Bordere, A.C.* Current and emerging therapy for the management of vitiligo, Clinical / A.C. Bordere, J. Lambert, N. van Geel // Cosmetic and Investigational dermatology.– 2009.– №2.– P. 15–25.

6. *Dell Anna, M.L.* A review and a new hypothesis for non-immunological pathogenetic mechanisms in vitiligo / M.L. Dell Anna, M. Picardo// Pigment Cell Res.– 2006.– №19.– P. 406–411.

7. *Leeuw, J.* A case study to evaluate the treatment of vitiligo with Khellin encapsulated in L-phenylalanin stabilized phosphatidylcholine liposomes in combination with ultraviolet light therapy / J. Leeuw [et al]// Eur. J. Dermatol.– 2003.– № 13.– P. 474–477.

8. *Leeuw, J.* Treatment of vitiligo with Khellin liposomes, ultraviolet light and blister roof transplantation / J. Leeuw [et al] // Eur. J. Acad Dermatol Venereol.– 2011.– №25.– P. 74–81.

9. *Schallreuter, K.U.* Activation/deactivation of acetylcholinesterase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: more evidence for oxidative stress in vitiligo / K.U. Schallreuter [et al]// Biochem. Biophys. Res. Commun.– 2004.– №315.– P. 502–508.

10. *Vaskovsky, V.E.* 1975. Universal reagent for phospholipids analysis / V.E. Vaskovsky, E.Y. Kostetsky, T. Vasensky // J. Chromatogr.– 1975.– № 114.– P. 129–141.