

Вплив меланіну на морфофункціональний стан шкіри щурів за умов хімічного опіку та вирізаної площинної рани

О.В. Табурець, В.В. Верещака, Т.В. Берегова, Л.І. Остапченко

Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка; e-mail: olesya8@ukr.net

*На білих нелінійних щурах-самцях (200–250 г) вивчали вміст води, колагену, виплавленої желатини і температури зварювання у шкірі тварин з вирізаними площинними ранами та хімічним опіком за умов їх корекції новою фармакологічною композицією на основі меланіну. Вирізаної рану моделювали за допомогою трафарету та хірургічного пінцету, хімічний опік – підшкірним введенням 0,1 мл (10 %) $CaCl_2$. Використовували поліфенольну сполуку – меланін, продуцентом якого є мікроорганізм *Pseudonadsoniella brunea*, висіяні зі зразків вертикальних скель острова Галіндез (Українська антарктична станція «Академік Вернадський»). Показано зменшення вмісту води в різаній рані на 36 %, при хімічному опіку на 48 %, збільшення вмісту колагену на 40 та 52 % відповідно, температури зварювання шкіри на 74 % при різаній рані та на 15 % при хімічному опіку шкіри та вмісту виплавленої желатини на 26 та 33 %, що пов'язано з метаболічними порушеннями у шкірі внаслідок її пошкодження. При корекції досліджуваної патології фармакологічною композицією на основі меланіну спостерігали нормалізацію досліджуваних показників: підвищення вмісту води в різаній та гнійній рані на 28 та 48 %, вміст колагену не відрізнявся від значень контрольної групи, оскільки не відбувалося рубцювання тканини, вихід желатини знижувався на 40 % у різаній рані, знижувалася температура зварювання шкіри. Створена нами композиція може бути рекомендована як дерматотропний засіб для лікування ран шкіри різного генезу.*

Ключові слова: вирізнана площинна рана; хімічний опік; колаген; меланін.

ВСТУП

Нині збільшення виробничого та побутового травматизму тісно пов'язано зі впливом на організм людини негативних чинників у результаті бойових поранень та травм мирного населення, техногенних катастроф, що супроводжується виникненням механічних пошкоджень, які призводять до порушення цілісності покривних тканин – утворенню шкірних ран [1-3]. Важливість питання травматизму зумовлена тим, що близько 6 % усього населення протягом року отримує якийсь пошкодження тіла.

Загоєння ран є важливим процесом з точки зору забезпечення анатомічної цілісності шкірних покривів і захисту її функціональної

© О.В. Табурець, В.В. Верещака, Т.В. Берегова, Л.І. Остапченко

структури, відбувається через регенерацію шкіри та інших м'яких тканин [7]. Рана розвивається у відповідь на травмування, що в кінці призводить до відновлення цілісності і функціонування травмованої ділянки [7]. Загоєння ран являє собою запрограмований процес, що складається з 3 безперервних фаз [8]: запальної реакції – (0-3 днів), клітинної проліферації – (3-12 днів), і ремоделювання – (3-6 міс) [9-11]. Порушення однієї із фаз ранового процесу може перервати процес загоєння рани і привести до ускладнень (тривало незагоєвання) [8].

Нашу увагу привернула поліфенольна сполука – меланін, продуцентом якого є чорні дріжджоподібні гриби *Pseudonadsoniella brunea*, висіяні зі зразків вертикальних

скель острова Галіндез (Українська антарктична станція «Академік Вернадський»). Ми створили нову фармакологічну композицію, до складу якої входить 0,1% меланіну, розчиненого в 0,5%-му карбополі (Carborol 980). Меланін має виражену бактерицидну дію на *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, що робить доцільним застосування композиційної суміші для лікування інфекційних гнійно-запальних процесів [12]. Відповідно до даних попередніх досліджень, застосування у місцевому лікуванні композиційної суміші дало змогу помітно знизити інфікування ранової поверхні, перекисне окиснення ліпідів у сироватці крові та зменшити навантаження на антиоксидантну систему, скорегувати перебіг усіх фаз ранового процесу, тобто композиція має виражені антибактеріальні та протизапальні властивості [13].

Метою нашого дослідження було визначення фізіологічних показників шкіри за умов експериментальної вирізаної площинної рани та хімічного опіку, їх корекції новою фармакологічною композицією на основі меланіну.

МЕТОДИКА

Для моделювання ранового процесу використовували білих нелінійних лабораторних щурів-самців віком 3-5 міс, масою 200-250 г. Утримання тварин та експерименти проведені згідно з етичним принципом, ухваленим Першим національним конгресом України з біоетики (2001), міжнародними угодами та національним законодавством у цій галузі [14] та біоетичною комісією ННЦ “Інститут біології” Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Перед початком експерименту щурів утримували на карантині та маркували нанесенням надсічок на вушні раковини та піддавали харчовій депривації з вільним доступом до води.

Усіх тварин розділили на чотири групи, по 10 у кожній: I група – інтактні тварини; II – контрольні, тварини у яких рана гоїлась

самостійно через епітелізацію; III та IV – тварини яким починаючи з наступного дня після моделювання рани двічі на добу впродовж усіх термінів спостереження наносили на ранову поверхню карбопол та фармакологічну композицію відповідно.

Площинні рани відтворювали на попередньо депільованій ділянці шкіри у наркотизованих щурів (тіопентал натрію 5мг/100г; Biochemie GmbH; Австрія). За допомогою квадратного трафарету та хірургічного скальпеля вирізали шкіру розміром 1×1 см [15]. Фармакологічну композицію наносили одразу після відтворення ран і до повного загоєння. Хімічний опік шкіри викликали підшкірним введенням 0,1мл CaCl₂. Розмір ран не повинен перевищувати 400 мм². На 4-5-ту добу здійснювали некротомію уражених ділянок і починали лікування ран до повного загоєння [16]. Для визначення відсотка вологи у тканині зразки шкіри зважували на аналітичних вагах і висушували до постійної маси при 80°C у сушильній шафі СНОЛ 3,5.3.5.3.5./И1 (Росія). При вивченні функціональних властивостей сполучної тканини досліджували вихід з колагену желатини гідротермічним зварюванням шкіри [17]. Температуру зварювання шкіри вимірювали з використанням приладу ПТЗ-1 (СРСР). Шматочок шкіри фіксували за допомогою гачків апарата, заливали водою та повільно нагрівали. Під впливом термічного фактора шкіра починала лінійно скорочуватись, що призводило до натягнення шнура і приведення в дію індикатора часового типу. Температуру зварювання визначали за ртутним термометром і вона відповідала початку руху стрілки індикатора. Для дослідження вмісту колагену використовували метод К'ельдаля [17].

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програмного пакета “GraphPad Prism 5.04” (“GraphPad Software Inc.”, USA). Їх перевіряли на нормальне розподілення за допомогою тесту Шапіро-Уїлка та на рівність дисперсій за тестом Левена. Подальший обрахунок здійснювали

за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу (two-way ANOVA) із пост-тестом Бонферонні. Отримані результати наведені у вигляді середнього арифметичного \pm середньоквадратичне відхилення (дисперсія) – SD. Результати вважали значущими при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що вміст вологи (табл.1) у шкірі тварин II, III і IV групи знижувався на 36, 35 і 18 % ($P \leq 0,05$) порівняно з інтактними тваринами, однак у IV групі спостерігали підвищення на 28% ($P \leq 0,05$) щодо значень тварин II групи.

У тварин із хімічним опіком відмічали подібну картину: зниження вмісту вологи в II, III та IV групах на 52, 56 та 77 % ($P \leq 0,05$) відповідно порівняно з I групою тварин і підвищення у тварин IV групи на 47 % ($P \leq 0,05$) щодо значень тварин II групи (табл.2). Ці зміни пов'язані зі зменшенням вмісту рідини в позаклітинному компоненті сполучної тканини, що в кінцевому результаті призводить до руйнування структури колагенових волокон [18].

Вміст колагену в дослідних зразках шкіри з різаними ранами навпаки підвищувався. Так, у II та III групах тварин цей показник зростав на 40 та 36 % ($P \leq 0,05$) відповідно порівняно з I групою тварин, тоді як в IV групі не було виявлено достовірних відмінностей щодо значень I групи тварин (див. табл. 1).

Наші результати збігаються з даними Маврова [19], який показав зменшення вмісту вологи, збільшення вмісту колагену та тем-

ператури зварювання у шкірних покривах, що вказує на метаболічні порушення при хронічних дерматозах.

Подібні зміни були виявлені і у тварин із хімічним опіком, вміст колагену в II та III групах тварин зростав на 52 та 34 % ($P \leq 0,05$) відповідно порівняно з I групою тварин. У тварин IV групи досліджуваній показник достовірно не відрізнявся від значень I групи тварин (див.табл.2).

Характерні зміни пов'язані з тим, що при травмуванні шкіри під час ранового процесу загоєння починається з гострої запальної фази і закінчується утворенням шраму. При рубцюванні накопичується колаген у відповідь на пошкодження тканини. Формування рубця, насамкінець, є результатом надмірного накопичення позаклітинного матриксу (ПМ). Хоча ремоделювання шрамів відбувається протягом місяців або років після початкової травми, повного відновлення нормальної архітектури ПМ ніколи не досягається. Таким чином, загоєння ран є фібропроліферативною відповіддю, що призводить до неповної регенерації ураженої тканини та надмірного продукування сітчастої структури колагену – рубцевої тканини. При використанні нової фармакологічної композиції загоєння відбулося без рубцювання тканини, що підтверджують наші дослідження (відсотковий вміст колагену в шкірі був меншим, ніж у нелікованих тварин II групи).

Вихід желатини шкіри у тварин з різаною раною в II та III групах зростав на 74 та 69% ($P \leq 0,05$) порівняно з I групою тварин, у IV групі він знижувався на 40% ($P \leq 0,05$) порівняно

Таблиця 1. Вміст вологи, колагену, виплавленої желатини і температура зварювання у шкірі тварин з вирізаними площинними ранами, (M \pm m, n=10)

Групи тварин	Вміст вологи, %	Вміст колагену, %	Виплавлення желатини, %	Температура зварювання, $^{\circ}$ C
Інтактні тварини (I група)	60,31 \pm 5,58	35,80 \pm 3,31	2,11 \pm 0,20	60,30 \pm 5,58
Контроль (II група)	38,47 \pm 2,89*	50,06 \pm 4,63*	3,67 \pm 0,34*	76,16 \pm 6,59*
Карбопол (III група)	39,24 \pm 3,11*	48,81 \pm 4,51*	3,56 \pm 0,33*	70,35 \pm 6,32*
Фармакологічна композиція (IV група)	49,16 \pm 4,18***	35,05 \pm 3,24**	2,22 \pm 0,21**	60,21 \pm 5,57**

Примітка: тут і в табл. 2 * $P < 0,05$ порівняно з I групою; ** $P < 0,05$ порівняно з II групою тварин

з тваринами II групи (див.табл.1). У тварин з гнійно-некротичною раною спостерігали підвищення цього показника на 62 та 58% ($P \leq 0,05$) в II та III групах тварин порівняно з I групою тварин; у тварин, яким наносили фармакологічну композицію (IV група не було виявлено статистично достовірних змін порівняно з I групою тварин. Ці зміни пов'язані зі зменшенням вмісту колагену в шкірі. При набуханні збільшуються водневі оболонки, які оточують колагенові волокна, послаблюються зв'язки між поліпептидними ланцюгами, як наслідок виникає обмежена пептидація. Утворюються комплекси, де пептидні зв'язки руйнуються легше, ніж у скелетному волокні. Желатина є сумішшю таких поліпептидних комплексів. Швидкість її утворення залежить від кількості води та ступеня набухання колагену, що спричинює желатинування. Вихід желатини при тривалому зварюванні шкіри більший у нелікованих тварин, що пов'язано з високим вмістом колагену.

Температура зварювання шкіри тварин з різаними ранами (II та III група) зростала на 26 та 17% ($P \leq 0,05$) відповідно порівняно з інтактними тваринами; у IV групі знижувалася на 21 % ($P \leq 0,05$) щодо значень у II групі. У тварин I та III груп цей показник за умов гнійно-некротичних ран зростав на 16 і 22% ($P \leq 0,05$) відповідно щодо значень щурів I групи. У щурів IV групи - поверталася до значень I групи. Раніше нами було показано, що у шкірі молодих людей вміст вологи та

колагену залишались в межах норми, у пацієнтів середнього віку зменшувався вміст вологи, а відсоток колагену залишався незмінним. Вміст вологи та колагену у шкірі осіб похилого віку значно зменшувався [18].

Таким чином, травмування шкіри супроводжується зменшенням вмісту вологи, збільшенням вмісту колагену та температури її зварювання, збільшенням вмісту виплавленої желатини. Зменшення вологи в дермі призводить до зниження гідратації колагенових волокон та їх деструкції як наслідок – патологічні зміни в шкірі, що свідчать про метаболічні порушення. Отже, при лікуванні шкірних ран ефективним є природний меланін, що входить до складу нової фармакологічної композиції, він проявляє антимікробну, ранозагоювальну, протизапальну дію та антиоксидантні властивості, за рахунок чого загоєння ран відбувається без рубцювання, що підтверджується меншим відсотком вмісту колагену в шкірі лікованих тварин порівняно з нелікованими.

ВИСНОВКИ

У експериментальній різаній рані в шкірі зменшується вміст вологи в дермі, що призводить до зниження гідратації колагенових волокон та їх деструкції, зростає вміст колагену, температура зварювання, збільшується вміст виплавленої желатини, характеризує патологічні зміни в шкірі.

Таблиця 2. Вміст вологи, колагену, виплавленої желатини і температура зварювання у шкірі тварин з хімічним опіком, ($M \pm m$, $n=10$)

Групи тварин	Вміст вологи, %	Вміст колагену, %	Виплавлення желатини, %	Температура зварювання, °C
Інтактні тварини (I група)	60,31±5,58	35,80 ± 3,3	2,11 ± 0,20	60,30± 5,58
Контроль (II група)	31,30 ± ,89*	54,36±5,03*	3,42 ± 0,13*	70,05 ±6,39*
Карбопол (III група)	33,64 ± ,11*	47,82±4,42*	3,34 ± 0,12*	73,46 ±6,80*
Фармакологічна композиція (IV група)	46,16±4,26*.*.*	37,12±3,43**	2,31 ± 0,21**	61,17±5,66**

При моделюванні хімічного опіку шкіри спостерігали подібні зміни: зменшення вмісту вологи, підвищення вмісту колагену, збільшення температури зварювання та зростання вмісту виплавленої желатини.

У разі застосуванні нової фармакологічної композиції всі вищезазначені показники поверталися до норми: підвищувався вміст вологи в різаній та гнійній ранах, вміст колагену не відрізнявся від контролю, оскільки не відбувалося рубцювання тканини, вихід желатини знижувався в різаній та гнійній ранах, зменшувалася температура зварювання шкіри в різаній рані та гнійній рані. Що свідчить про ефективність досліджуваної композиції на основі меланіну для лікування ран шкіри різного генезу.

The authors of this study, O.V. Taburets, V.V Vereschaka, T.V. Beregova, L.I. Ostapchenko, confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

О.В. Табурец, В.В. Верещака, Т.В. Береговая, Л.І. Остапченко

ВЛИЯНИЕ МЕЛАНИНА НА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КОЖИ КРЫС ПРИ ХИМИЧЕСКОМ ОЖОГЕ И ВЫРЕЗАНОЙ ПЛОСКОСТНОЙ РАНЕ

На белых нелинейных крысах-самцах (200-250 г) исследовали содержание влаги, коллагена, выплавленной желатини и температуру сварки в коже животных с вырезанными плоскостными ранами и химическим ожогом без лечения и при условии их коррекции новой фармакологической композиции на основе меланина. Вырезанную рану моделировали с помощью трафарета и хирургического пинцета, химический ожог – подкожным введением 0,1 мл (10 %) CaCl_2 . Использовали полифенольное соединение – меланин, продуцентом которого являются микроорганизмы *Pseudonadsoniella brunea*, высеченные с образцов вертикальных скал острова Галиндез (Украинская антарктическая станция «Академик Вернадский»). Показано снижение содержания влаги в вырезанной плоскостной ране на 36%, в случае химического ожога на 48% , увеличение содержания коллагена на 40 и 52% соответственно,

увеличение в коже при резаной ране и химическом ожоге, температуры сваривания на 26 и 16% соответственно и возрастание содержания расплавленной желатини на 74 и 62 %, что связано с нарушениями обмена веществ в коже в результате ее повреждения. При коррекции патологии фармакологической композицией на основе меланина наблюдали нормализацию исследуемых параметров: увеличение содержания влаги в резаной и гнойной ране на 28 и 47%, содержание коллагена не отличалось от значений контрольной группы, поскольку тканевое рубцевание не происходило, выход желатини уменьшался на 40 % в резаной ране, температура сваривания кожи уменьшалась. Созданная нами композиция на основе меланина может быть рекомендована как дерматотропное средство для лечения ран кожи различного генеза.

Ключевые слова: вырезанная плоскостная рана; химический ожог; коллаген; меланин.

O.V. Taburets, V.V Vereschaka, T.V. Beregova, L.I. Ostapchenko

INFLUENCE OF MELANINE ON MORPHOFUNCTIONAL INDICES OF RAT SKIN WITH CHEMICAL BURNER AND FULL-THICKNESS WOUND

On white nonlinear male rats (200-250 g), we investigated the content of moisture, collagen, melted gelatin and the temperature of welding in the skin of animals with full-thickness wounds and chemical burn, without treatment and under the treatment by a new pharmacological melanin-containing composition. The physical and chemical indices of the skin were examined on white nonlinear male rats (the full-thickness wound was simulated with a stencil and surgical tweezers, chemical burn, by subcutaneous injection with 0.1 ml (10%) of CaCl_2 . Moisture content was reduced by 36% in a wound, during chemical burn by 48%. In addition, we observed an increase in the collagen content by 40 and 52%, respectively. When correcting the pathology by melanin, the normalization of the investigated parameters was detected. As tissue scarring does not occur, the gelatin yield decreases in the cut wounds by 40 %, and the skin welding temperature decreases. The melanin composition that we created can be recommended as a dermatotropic agent for the treatment of skin wounds of various origins.

Key words: full-thickness wound; chemical burn; collagen; melanin.

*Education and Research center «Institute of Biology» Taras Shevchenko National University of Kyiv;
e-mail: olesya8@ukr.net*

REFERENCES

1. Guo S, Dipietro L. Factors affecting wound healing. J Dent Res. 2010 Mar; 89 (3):219-29.

2. Cheret J, Lebonvallet N, Carre J, Misery L. Influence of sensory neuropeptides on human cutaneous wound healing process. *J Dermatol Sci*. 2014; Jun 74(3):193-203.
3. Hamed S, Bennett C.L, Demiot C, Desmouliere A. Erythropoietin, a novel repurposed drug: an innovative treatment for wound healing in patients with diabetes mellitus. *Wound Repair Regen*. 2014;22(1):23-33.
4. Orda OM, Lyubinetz AV, Yaschenko YB, Semeniuk OA. Characteristics mortality of the population Ukraine. *Innovations in medicine*. 2011;7(2):61-2. [Ukrainian].
5. Khyzhnyak AA, Dubivska SS, Veklych IA. Multiple injuries: methodical pointing specialty «Medical emergency conditions» for the training of interns. *KhNMU*. 2014:20-8. [Ukrainian].
6. Cetin EO, Yesil-Celiktas O, Cavusoglu T. Incision wound healing activity of pine bark extract containing topical formulations: A study with histopathological and biochemical analyses in albino rats. *Pharmazie*. 2013;68:75-80.
7. Sun BK, Siprashvili Z, Khavari PA. Advances in skin grafting and . treatment of cutaneous wounds. *Science*. 2014;346:941-5.
8. Richmond NA, Lamel SA, Davidson JM, Martins-Green M, Sen CK, Tomic-Canic M, Vivas AC, Braun LR, Kirsner RS. US–National Institutes of Health-funded research for cutaneous wounds in 2012. *Wound Repair Regen*. 2013;21:789-92. [PubMed].
9. Garg VK, Paliwal SK. Wound-healing activity of ethanolic and aqueous ex- tracts of *Ficus benghalensis*. *J Adv Pharm Technol Res*. 2011;2:110-4.
10. Maxson S, Lopez EA, Yoo D et al. Concise review: Role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1:142-9.
11. Nayak BS, Anderson M, Pinto Pereira LM: Evaluation of wound-healing potential of *Catharanthus roseus* leaf extract in rats. *Fitoterapia*. 2007;78:540-4.
12. Taburets OV, Morgaienko OO, Kondratiuk TO, Bereгова TV, Ostapchenko LI. The Effect of «Melanin-Gel» on the Wound Healing. *RJPBCS*. 2016;7(3):2031-8.
13. Taburets OV, Grinchenko OO, Dvorschenko KO, Vereschaka VV, Ostapchenko LI. Influence of the melanin on the state of prooxidant-antioxidant homeostasis in blood serum at the rats with the full-thickness skin wound. *Bulletin of problems biology and medicine*. 2017;1(135):191-6. [Ukrainian].
14. The first national congress on bioethics. *Ezhenedelnyk PHARMACY*. 2001;308(37)(from 24.09.2001). [Ukrainian].
15. Marik PE, Flemmer M. The immune response to surgery and trauma: Implications for treatment. *J Trauma Acute Care Surg*. 2012;73(4):801-8.
16. Bilyayeva O, Neshta V, Golub A, Sams-Dodd F. Effects of SertaSil on wound healing in the rat. *J Wound Care*. 2014 Aug;23(8):140-6.
17. Okhmat OA, Plavan VP, Mokrousova OP, Danilkovich AG. Chemical analysis and physical and mechanical tests of skin and fur: methodological instructions for laboratory work on the discipline «Analytical control in fur and leather production». *KNUTD*. Kiev. 2006; 60-4. [Ukrainian].
18. Vereshchaka VV. Physico-chemical properties of the collagen of the skin of healthy people of all ages and people with symptoms of senile sagging. *Dermatol and Venereol*. 2007; 4 (38):12-8. [Ukrainian].
19. Mavrova DI. Metall maintenance and physical-chemical indices of unaffected skin site under chronic dermatosis. *Dermatol and Venereol*. 2009;3(45):62-6.

Матеріал надійшов до редакції 26.04.2017.