

ДОСЛІДЖЕННЯ ПІДГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ ПРЕПАРАТУ МЕЛАНІН ЗА ПОКАЗНИКАМИ БІОХІМІЧНИХ ТА МОРФОЛОГІЧНИХ ЗМІН ПЕЧІНКИ У ЩУРІВ

О.К.Вороніна¹, Д.В. Голишкін², С.М. Береговий¹, Т.В.Берегова¹, Л.І. Остапченко¹

¹Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини»

Київського національного університету імені Тараса Шевченка, м. Київ, Україна

²ТОВ «Юрія Фарм», м. Київ, Україна

РЕЗЮМЕ. Вивчено підгостру токсичність на щурах природного пігменту меланіну, продуцентом якого є антарктичні дріжджеподібні гриби *Pseudonadsoniella brunnea*. Досліджено морфологічні та біохімічні зміни печінки щурів при 14-денному внутрішньогастральному введенні меланіну в дозах 50, 100 і 200 мг/кг ваги тіла. Показано, що меланін не викликав значущих патологічних змін морфо-функціонального стану печінки щурів. Це характеризує його як досить безпечний засіб при тривалому застосуванні.

Ключові слова: меланін, підгостра токсичність, морфо-функціональний стан печінки.

Вступ. Дослідження впливу поліфенольних сполук на здоров'я людини значно збільшились за останні 10 років. Це пов'язане з роллю поліфенолів у профілактиці дегенеративних захворювань шлунково-кишкового тракту, серцево-судинної системи, статевих систем тощо, а також з розвитком запалення й канцерогенезу. Антиоксидантні властивості поліфенолів давно вивчені, але останнім часом з'являються дані про інші механізми їхньої проєктивної дії, зокрема вплив на сигнальні шляхи клітини, на потенціал мітохондріальної мембрани, зниження активності каспази-3 [1]; в пухлинних клітинах – пригнічення металопротеїназ та білків, що регулюють реплікацію та трансформацію ДНК [2].

Серед різноманіття поліфенольних сполук особливе місце посідає пігмент меланін, що присутній майже в усіх живих організмах. Доведено його фотопротекторну [3], радіопротекторну [4, 5], стрес-протекторну [6], нейропротекторну [7], гепатопротекторну [8], гастропротекторну [9], протипухлинну [10] дію.

Отже, створення нових лікарських препаратів на основі природного пігменту меланіну обґрунтоване та є перспективним. Одним з перших етапів таких розробок є дослідження токсичності меланіну.

Метою дослідження було оцінити підгостру токсичність меланіну за показниками біохімічних та патоморфологічних змін печінки у щурів.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження виконані на 80 білих лабораторних щурах лінії Wistar масою 180–260г. У відповідності до передбаченого в клініці шляху введення застосовували інтрагастральний шлях введення тест-зразка «Меланіна» м'яким шлунковим катетером. Дослідження підгострої токсичності тривали 14 днів.

Продуцентом меланіну є антарктичні дріжджеподібні гриби *Pseudonadsoniella brunnea* (раніше *Nadsoniella nigra* штам X-1), висіяні в ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка із зразків вертикальних скель о.Галіндез Аргентинського архіпелагу (Українська антарктична станція «Академік Вернадський») [11].

Для визначення режиму дозування препарату в необхідні терміни реєстрували індивідуальну масу тіла щурів. Досліджувані дози визначалися виходячи з максимально переносимої дози – 200 мг/кг ваги тіла при одноразовому введенні. Також досліджувались дози j, S, від DL0, що відповідало дозам 50 та 100 мг/кг.

Щури рандомізовано були поділені на 4 групи: перша – контрольна – тварини отримували фізрозчин протягом 14 днів; друга група одержували меланін у дозі 50 мг/кг ваги тіла; третя – 100 мг/кг ваги тіла; і четверта – 200 мг/кг ваги тіла (максимальна доза, яку можна одноразово вводити). У кожній групі було 20 щурів – по 10 самок та 10 самців.

Експерименти проведені з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [12], у відповідності до Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» [13] та згідно з етичними нормами і правилами роботи з лабораторними тваринами (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Academy Press, Washington DC, 1996) [14].

Протягом 14 діб спостерігали за фізіологічними змінами та змінами у вазі тіла у піддослідних тварин. Після завершення експерименту всіх тварин зважували, після чого підлягали миттєвій декапітації.

Для гістологічного дослідження печінка була зафіксована в 10% розчині нейтрального формаліну, після чого за стандартною гістологічною методикою була залита в парафін. Гістологічні зрізи товщиною 7 мкм виготовляли на роторному мікротомі та фарбували гематоксиліном Бьомера та еозином. Кольорові мікрофотографії отримували за допомогою цифрової фотокамери Olympus C-5050 Zoom (Olympus Europe GmbH, Японія) та мікроскопа Olympus BX-41 (Olympus Europe GmbH, Японія)

Біохімічні дослідження включали аналіз показників сироватки крові, що характеризують функціональний стан печінки, а саме: аланінамінотрансфераза, альбумін, лужна фосфатаза, аспаратамінотрансфераза, білірубін, гама-глутамілтрансфераза, загальний

білок, холестерин за допомогою тест-наборів фірми «Global Scientific» (США).

Порівняння різниці між контрольними і дослідними показниками проводили за допомогою t-критерію Стьюдента для незалежних вибірок.

Результати досліджень та їх обговорення. За результатами вивчення показників летальності щурів встановлено, що підгостре введення меланіну не призводило до загибелі щурів, виживаність становила 100% незалежно від дози тест-зразка. Відразу після введення меланіну та упродовж всього терміну спостереження змін у функціональному стані тварин не виявлено. Загальний стан тварин задовільний: вони були вгодованими, шерсть гладкою і шовковистою, шкіра не ушкоджена, слизові чисті.

При розтині всіх тварин встановлено, що внутрішні органи мали правильне анатомічне розташування. Величина і форма печінки усіх груп тварин у межах норми. Печінка була розділена на 4 частки, краї долей – не закруглені. Поверхня органу – гладка, без новоутворень і вузлів. Капсула печінки тонка, прозора, не напружена. Паренхіма органа мала червоно-коричневий колір і помірно щільну консистенцію.

У ході експерименту також була визначена маса внутрішніх органів та їхня відносна маса (табл.1). У щурів меланін у всіх дозах зменшував відносну масу печінки. Так, у групі самців, яким вводили тест-зразок у дозі 200 мг/кг, відносна маса

Таблиця 1

Відносна маса печінки щурів при вивченні підгострої токсичності тест-зразка «Меланін»

Досліджуваний орган	Стать	Відносна маса органів залежно від дози препарату, %			
		0 мг/кг	50 мг/кг	100 мг/кг	200 мг/кг
Печінка	♂	7,526±0,38	5,627±0,173***	6,38±0,179**●●	6,186±0,23**
	♀	7,069±0,3	5,724±0,204**	5,258±0,184***	5,668±0,139**

* – $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ – відносно тварин контрольної групи;

● – $p \leq 0,05$ – відносно тварин, яким вводили меланін у дозі 50 мг / кг.

печінки зменшилася на 17,8% ($p \leq 0,01$) порівняно з контролем, у самок – 19,8% ($p \leq 0,01$). Меланін у дозі 100 мг/кг зменшував масу печінки у самців та самок на 15,2% ($p \leq 0,01$) і 25,6% ($p \leq 0,001$) відповідно. Введення препарату в дозі 50 мг/кг зменшувало відносну масу печінки у самців на 25,2% ($p \leq 0,001$), у самок – 19% ($p \leq 0,01$) у порівнянні з контролем. Також було встановлено збільшення печінки у самців, яким вводили меланін у дозі 100 мг/кг, на 13,4% ($p \leq 0,05$) у порівнянні з самцями, яким вводили в дозі 50 мг/кг.

Морфологічна будова печінки щурів контрольної групи в нормі, спостерігається радіальна спрямованість печінкових трабекул, межі печінкових часточок чіткі, центральна вена заповнена кров'ю (рис.1). Гепатоцити мають полігональну форму, містять чіткі 1-2 ядра з ядерцями, цитоплазма слабо рожевого кольору. Ступінь виразності анізонуклеозу незначний, кількість двоядерних клітин помірна. У мікроциркуляторному руслі порушень не виявлено. На підставі морфо-функціонального аналізу можна зробити висновок про помірний функціональний стан печінки.

При введенні меланіну в дозі 50 мг/кг у печінці не спостерігається морфологічних змін, трабекули мають чіткі межі. Кровонаповнення органа в нормі. Гепатоцити полігональної форми, в їх цитоплазмі спостерігається посилення базофілії. Клітини містять 1-2 ядра в центрі, в яких чітко розрізняються ядерця, еу- та гетерохроматин.

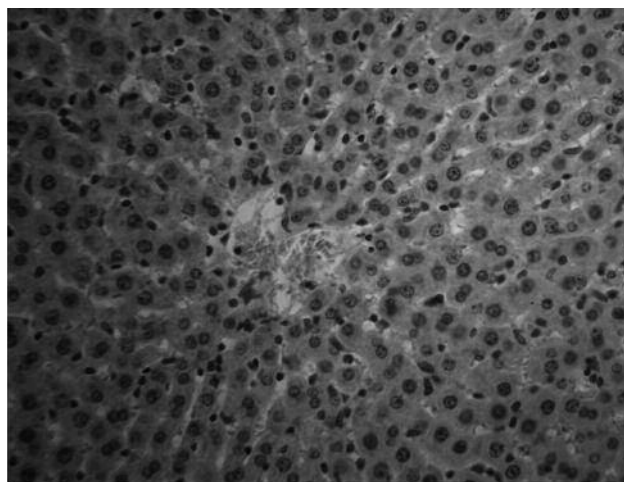


Рис.1. Мікрофотографія печінки щура контрольної групи (зabarвлення гематоксиліном-еозином. 3б.×400).

У цілому будова печінки відповідає фізіологічній нормі (рис.2).

При введенні препарату в дозі 100 мг/кг будова печінкових трабекул зберігається, але міжтрабекулярні щілини дещо звужені. В гепатоцитах спостерігається набряк, у деяких клітинах помітна вакуолізація цитоплазми, що свідчить про розвиток зернистої дистрофії. Ядра клітин гіперхромні. Отже, в печінці помітні перші ознаки білкової дистрофії, але відомо, що ранні зернисті дистрофічні зміни обернені і не несуть за собою фізіологічної недостатності органа (рис.3).

При збільшенні дози до 200 мг/кг гепатоцити та купферовські клітини дещо набрякли, гіпертрофовані, трабекулярний

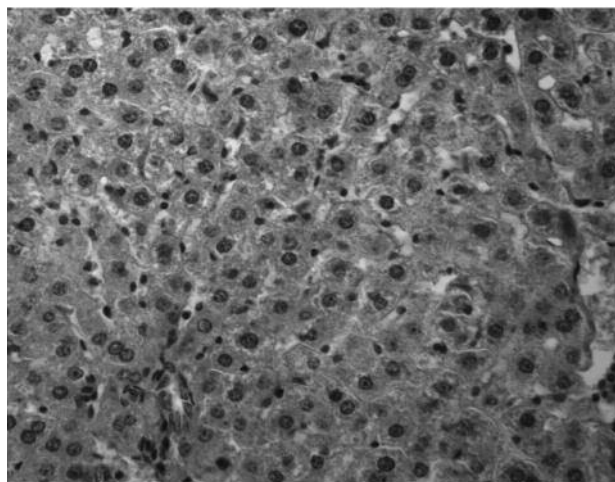


Рис.2. Мікрофотографія печінки щура, що отримував меланін у дозі 50мг/кг (зabarвлення гематоксиліном-еозином. 3б.×400).

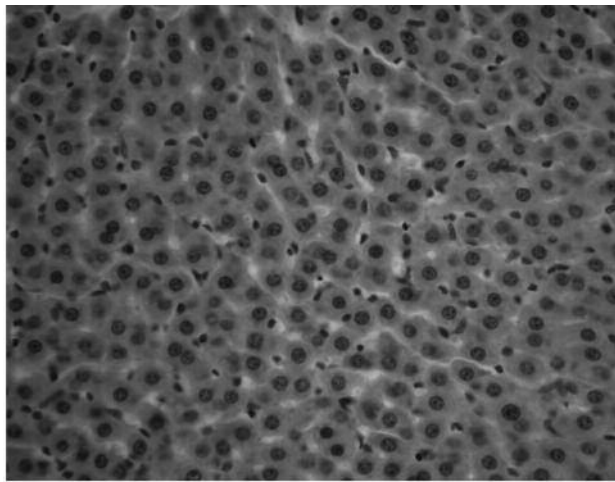


Рис.3. Мікрофотографія печінки щура, що отримував меланін у дозі 100мг/кг (зabarвлення гематоксиліном-еозином. 3б.×400).

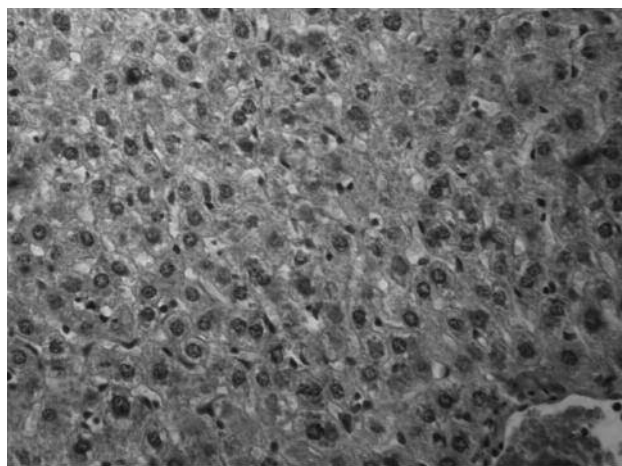


Рис. 4. Мікрофотографія печінки щура, що отримував меланін у дозі 200мг/кг (забарвлення гематоксилином-еозином. 36.×400).

рисунок нечіткий, помітні вогнищеві розширення міжтрабекулярних щілей. Міждолькові артерії наповнені кров'ю. Проте ядра гепатоцитів залишаються слабо базофільними, в них переважає еухроматин; чітко помітні 1-2 ядерця. Цитоплазма гепатоцитів містить дрібні і крупні краплини жиру та білка, що свідчить про ознаки ранніх дистрофічних змін. Ознак запалення або некрозу не виявлено (рис.4). Отже, в паренхімі органа помітні ознаки жирової та зернистої дистрофії (найчастіше є зворотними при усуненні дії патологічного чинника), що свідчить про порушення білково-ліпідного обміну, можливо, внаслідок інтоксикації.

Отже, суттєвих морфологічних змін у печінці при введенні меланіну не спостерігалось. Але слід відзначити, що досліджуючи токсичний вплив меланіну в дозах 100 та 200 мг/кг, було помічено дозозалежні ознаки жирової та білкової дистрофії, хоча відомо, що такі зміни є оберненими за умови усунення патологічного чинника [15, 16].

Біохімічні зміни показників крові показали, що меланін у дозі 50 та 100 мг/кг у самок не чинив значущого впливу на показники вмісту як загального білка, так і альбуміну в крові тварин, показники яких знаходилися на рівні контрольних значень. Введення меланіну в дозі 100 мг/кг у самців і в дозі 200 мг/кг у тварин обох статей не призводило до статистичної зміни

загального білка і альбуміну в сироватці крові відносно контролю. Це свідчить про те, що білковий обмін не змінювався у щурів. Активність гама глутамілтранспептидази (ГГТ), ферменту, який бере участь в обміні амінокислот, статистично значуще не змінювалася.

Особливої уваги заслуговують показники вмісту білірубину, холестерину і лужної фосфатази в сироватці крові, оскільки вони відображають стан печінки експериментальних тварин і розвиток цитолітичних процесів під впливом досліджуваного препарату. Підвищений білірубін – симптом гострих та хронічних захворювань печінки; токсичних та лікарських отруєнь печінки з наступними порушеннями у діяльності всього організму. В експерименті меланін істотно не впливав на вміст білірубину і холестерину в сироватці крові в усіх дозових групах тварин обох статей (табл. 2).

Рівень холестерину і лужної фосфатази при введенні меланіну у високій дозі (200 мг/кг) не збільшувався у порівнянні з контролем. Отже, функціональний стан печінки не порушувався.

Дослідження рівня загального білка, аланін амінотрансферази (АлАТ), аспартамінотрансферази (АсАТ) виявило, що дані показники після дії меланіну суттєво не змінювалися. Ці результати також підтверджують, що стан печінки залишився в межах фізіологічної норми.

Отже, в результаті 14-денного введення меланіну суттєвих морфологічних та функціональних змін у печінці не спостерігалось. Але слід відзначити, що при дослідженні токсичного впливу меланіну в дозах 100 та 200 мг/кг були помітні дозозалежні ознаки жирової та білкової дистрофії, хоча відомо, що такі зміни є оберненими за умови усунення патологічного чинника.

Висновки. Дослідження підгострої токсичності меланіну на щурах показало, що при введенні меланіну в дозах 50, 100 і 200 мг/кг меланін не викликав значущих патологічних змін морфо-функціонального стану печінки щурів, що характеризує його як досить безпечний засіб при тривалому застосуванні.

**Біохімічні показники крові щурів, які характеризують функціональний стан печінки
при вивченні підгострої токсичності в умовах введення меланіну**

Показник	Стать	Контроль вода (14 доба)	Меланін (14 доба)		
			50 мг/кг	100 мг/кг	200 мг/кг
Загальний білок, г/л	♂	68,49±1,3	67,5±1,7	68,9±1,4	69,0±0,5
	♀	68,9±1,1	68,3±1,2	69,3±1,8	68,4±1,3
АлАТ, МО/л	♂	71,4±3,0	73,5±2,0	75,0±3,1	74,9±6,1
	♀	73,0±3,4	72,0±2,9	74,2±4,1	73,3±7,2
АсАТ, МО/л	♂	189,5±12,0	192,3±20,1	197,5±13,7	182,8±14,1
	♀	201,5±23,2	198,0±20,3	192,3±11,2	205,9±16,0
Холестерин, ммоль/л	♂	1,68±0,05	1,67±0,09	1,7±0,03	1,71±0,07
	♀	1,65±0,05	1,63±0,1	1,69±0,09	1,7±0,08
Білірубін, мкмоль/л	♂	0,86±0,03	0,90±0,06	0,93±0,13	0,97±0,09
	♀	0,96±0,08	0,94±0,3	1,0±0,2	1,4±0,14 [▲]
Альбумін, г/л	♂	37,2±0,3	35,4±0,5	37,2±0,53	34,1±0,4
	♀	35,9±0,5	33,0±0,6	37,1±0,41	34,0±0,7
ГГТ, МО/л	♂	1,33±0,2	1,5±0,12	1,55±0,19	1,3±0,3
	♀	1,49±0,15	1,4±0,2	1,5±0,17	1,5±0,19
ЛФ, МО/л	♂	226,0±11,3	222,0±9,1	203,0±19,6	225,6±46,7
	♀	237,0±11	230,1±13,0	188,2±21	251,0±15,3

▲ – $p \leq 0,05$ різниця між статтями; АлАТ – аланінамінотрансфераза;
АсАТ – аспартатамінотрансфераза; ГГТ – гама-глутамілтрансфераза; ЛФ – лужна фосфатаза.

ЛІТЕРАТУРА

1. Therapeutic properties of green tea against environmental insults / L. Chen, H. Mo, L. Zhao [et al.] // *J. Nutr. Biochem.* – 2017. – № 40. – P. 1–13.
2. Ping Dou Q. Molecular Mechanisms of Green Tea Polyphenols / Q. Ping Dou // *Nutr. Cancer.* – 2009. – № 61(6). – P. 827–835.
3. Solano F. Melanins: Skin Pigments and Much More – Types, Structural Models, Biological Functions, and Formation Route / F. Solano // *New Journal of Science* Volume. – 2014. – P. 1–28.
4. Melanin, a promising radioprotector: mechanisms of actions in a mice model / A. Kunwar, B. Adhikary, S. Jayakumar [et al.] // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2012. – № 264(2). – P. 202–211.
5. Melanin is effective in protecting fast and slow growing fungi from various types of ionizing radiation / C. Pa-
celli, R. Bryan, S. Onofri [et al.] // *Environ Microbiol.* – 2017. – № 19(4). – P. 1612–1624.
6. The influence of melanin on the gastric mucosa and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis under acute stress conditions / D. Golyshkin, T. Falalyeyeva M, K. Neporada [et al.] // *Fiziol Zh.* – 2015. – № 61(2). – P. 65–72.
7. Brenner S. Parkinson's disease may be due to failure of melanin in the Substantia Nigra to produce molecular hydrogen from dissociation of water, to protect the brain from oxidative stress / S. Brenner // *Med Hypotheses.* – 2014. – № 82(4). – P. 503–508.
8. Effects of polyphenol compounds melanin on NAFLD/NASH prevention / N. Belemets, N. Kobyliak, O. Virchenko [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2017. – № 88. – P. 267–276.

9. Farzaei M.H. Role of dietary polyphenols in the management of peptic ulcer / M. H. Farzaei // World journal of gastroenterology: WJG. – 2015. – Vol. 21, No. 21. – P. 6499–6517
10. El-Naggar N. Bioproduction, characterization, anti-cancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H / N. El-Naggar, S. El-Ewasy // Sci Rep. – 2017. – №7. – P. 4212–4223.
11. Confirmation of taxonomic status of black yeast-like fungus by three gene phylogeny / T.O. Kondratiuk, S.Y. Kondratyuk, M.V. Khimich [et al.] // Acta Botanica Hungarica. – 2016. – V. 59, Issue 3-4, P. 287-302.
12. Rozemond H. Laboratory animal protection: the European Convention and the Dutch Act. / H. Rozemond // Vet. Q. – 1986. – V. 8. – P. 346–349.
13. Закон України від 21.02.2006 № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження»: 2006.
14. Life Sciences C.I. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals // Laboratory Animals. – 1996. – V. 66, № 4. – 248 p.
15. Струков А. И. Патологическая анатомия. / А. И. Струков, В.В.Серов. – М.: ГОЭТАР-Медиа. 2015. – 880с.
16. Physiological and biochemical basis of clinical liver function tests: a review / L.T. Hoekstra, W. de Graaf, G.A. Nibourg [et al.] // Ann. Surg. – 2013. – Vol. 257, №1. – P. 27–36.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПОДОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТА МЕЛАНИН
ПО ПОКАЗАНИЯМ БИОХИМИЧЕСКИХ И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПЕЧЕНИ У КРЫС**

Е.К. Воронина¹, Д.В. Гольшкін², С.М. Береговой¹, Т.В. Береговая¹, Л.И. Остапченко¹

¹Учебно-научный центр «Институт биологии и медицины»

Киевского Национального университета имени Тараса Шевченко, г. Киев, Украина

²ООО «Юрия Фарм», г. Киев, Украина

РЕЗЮМЕ. Исследована подострая токсичность на крысах естественного пигмента меланина, продуцентом которого являются антарктические дрожжеподобные грибы *Pseudonadsoniella brunnea*. Проанализированы морфологические и биохимические изменения печени крыс при 14-дневном интрагастральном введении меланина в дозах 50, 100 и 200 мг/кг веса тела. Показано, что меланин не вызывал значительных патологических изменений морфо-функционального состояния печени крыс. Это характеризует его как достаточно безопасный препарат при длительном использовании.

Ключевые слова: меланин, подострая токсичность, морфо-функциональное состояние печени.

**STUDY OF MELANIN SUBACUTE TOXICITY ACCORDING
TO THE INDICES OF BIOCHEMICAL
AND MORPHOLOGICAL LIVER CHANGES IN RATS**

O. Voronina¹, D. Golyshkin², S. Beregovyi¹, T. Beregova¹, L. Ostapchenko¹

¹ESC «Institute of Biology and Medicine» Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

²«Yuria Pharm», Kyiv, Ukraine

ABSTRACT. Sub-acute toxicity of a natural pigment melanin, produced by Antarctic yeast-like fungi *Pseudonadsoniella brunnea* was studied in rats. Morphological and biochemical changes in liver of rats following 14-day intragastric treatment with melanin in doses 50, 100, or 200 mg/kg bw were evaluated. It was shown that melanin injections did not cause significant pathological changes in the rats liver. This presumes melanin to be safety used for long-term treatments.

Key words: melanin, subacute toxicity, morpho-functional state of the liver.

Надійшла до редакції 19.06.2017