

Abstract

*Tsulun O. V. *,
National University of Pharmacy,
53 Pushkinska St., Kharkiv, 61002,
Ukraine*

**STUDYING OF REPARATIVE PROPERTIES OF A NEW
COMBINED OINTMENT ON THERMAL BURN MODELS IN
RATS**

Introduction. Burn can be defined as a tissue damage caused by a variety of agents such as heat, chemicals, electricity, sunlight, or nuclear radiation. Treatment of burns has an important medico-social significance in order to speed up the recovery of injured people and return them working ability. One of perspective directions is to create preparations that possess antioxidant properties, have sufficient reparative anti-inflammatory effect, and are safe.

My **aim** is to assess the effect of a topical ointment with licorice extract, coenzyme Q10 and dihydroquercetin (further mentioned as LCD ointment) on healing of partial thickness burn wounds in rats.

Material and Methods. Burns were modeled on 20 albino rats, weighting 260–300 g under ketamine (100 mg/kg) anesthesia by pouring hot molten wax at 80°C into pattern of 4 cm² placed on depilated skin on one side of the animals. Rats were divided into four groups: group 1 – control group; group 2 – treated with LCD ointment; group 3 – treated with methyluracil ointment (reference-drug); group 4 – treated with ointment containing rutin, coenzyme Q10 and licorice extract (further mentioned as LCR ointment). Ointments were applied topically once a day. I performed evaluation by measuring wound contraction and recording the period of epithelialization.

Results and Discussion. Topical application of ointments LCD and LCR enhanced significantly healing of burn wounds. The mean period of epithelialization was significantly reduced in topical LCD ointment (by 31.5%) group and LCR ointment (by 20.4%) group as compared to the control.

Conclusion. I established that ointments LCD and LCR promoted healing of burns and exhibited evident reparative activity on the model of wax-induced burn wounds in rats. Ointments LCD and LCR reduced epithelialization period by 6.8 and 4.4 days respectively, compared to the control group. Planimetric parameters showed that burn area decreased by 63.5% on day 5 and by 98.2% on day 15 in LCD treated group; in LCR ointment group percentages of wound contraction were 44.6% and 94% respectively, which exceeded reference-drug. Therefore, ointments LCD and LCR have expressed reparative activity; they can become promising drugs for further pharmacological studies to use in clinical practice.

Key words: dihydroquercetin, licorice extract, thermal burn, reparative properties, ointment.

Corresponding author: *elena_culun@mail.ru

Резюме

Цулун О. В. *,
Національний фармацевтичний
університет,
вул. Пушкінська, 53, Харків,
61002, Україна

**ДОСЛІДЖЕННЯ РЕПАРАТИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ
НОВОЇ КОМБІНОВАНОЇ МАЗІ НА МОДЕЛІ ТЕРМІЧНОГО
ОПІКУ У ЩУРІВ**

Лікування опіків має важливе медико-соціальне значення для прискорення одужання потерпілих та повернення їм працездатності. Одним із перспективних напрямків є створення препаратів, що мають антиоксидантні властивості і чинять достатню репаративну, протизапальну дію та мають високий показник безпечності. В статті наведені результати експериментального дослідження репаративної дії мазей на основі дигідрокверцитину, коензиму Q10 та екстракту солодки, на основі рутину, коензиму Q10 та екстракту солодки та препарату порівняння мазі метилурацилової. Встановлено, що на моделі опікової рани воском у щурів мазі з дигідрокверцетином та рутином сприяють загоєнню опікових ран та проявляють виражену репаративну активність. За лікувальною дією досліджувані мазі не поступалися дії препарату порівняння. Досліджувані мазі мають виражену репаративну активність та є перспективними препаратами для подальшого фармакологічного дослідження з метою впровадження в клінічну практику.

Ключові слова: дигідрокверцетин, екстракт солодки, термічний опік, репаративні властивості, мазь.

Резюме

Цулун Е. В. *,
Національний
фармацевтичний університет,
ул. Пушкінская, 53, Харків,
61002, Україна

**ИССЛЕДОВАНИЕ РЕПАРАТИВНЫХ СВОЙСТВ НОВОЙ
КОМБИНИРОВАННОЙ МАЗИ НА МОДЕЛИ
ТЕРМИЧЕСКОГО ОЖОГА У КРЫС**

Лечение ожогов имеет важное медико-социальное значение для ускорения выздоровления пострадавших и возвращения им трудоспособности. Одним из перспективных направлений является создание препаратов, которые обладают антиоксидантными свойствами и оказывают достаточное репаративное, противовоспалительное действие и имеют высокий показатель безопасности. В статье приведены результаты экспериментального исследования репаративного действия мазей на основе дигидрокверцитина, коэнзима Q10 и экстракта солодки, на основе рутина, коэнзима Q10 и экстракта солодки и препарата сравнения мазі метилурацилової. Установлено, что на модели ожоговой раны воском у крыс мазі с дигидрокверцетином и рутином способствуют заживлению ожоговых ран и проявляют выраженную репаративную активность. По лечебному действию исследуемые мазі не уступали действию препарата сравнения. Исследуемые мазі имеют выраженную репаративную активность и являются перспективными препаратами для дальнейшего фармакологического исследования с целью внедрения в клиническую практику.

Ключевые слова: дигидрокверцетин, экстракт солодки, термический ожог, репаративные свойства, мазь.

Автор, відповідальний за листування: * elena_culun@mail.ru

Вступ

Опікова травма – це найбільш поширене травматичне пошкодження у світі. Опіки можуть виникати під дією термічних, хімічних, електричних подразників, ультрафіолетового та радіаційного опромінення [1–4]. Лікування опіків має важливе медико-соціальне значення для прискорення одужання потерпілих та повернення їм працездатності [1]. При опіках пошкодження тканин викликає ланцюг реакцій в організмі, спрямованих на відновлення біологічної цілісності та регенерацію ураженої ділянки [1, 5]. Упродовж загоєння поступово змінюються процеси запалення, проліферації та міграції різних типів клітин. Гостра реакція у вигляді запалення призводить до активації та надходження фагоцитів (нейтрофілів, макрофагів та ін.) у місце ураження. Як відомо, активовані нейтрофіли продукують надмірну кількість активних форм кисню (АФК), що призводить до так званого «кисневого вибуху» [6]. Також АФК утворюються внаслідок порушення транспорту в дихальному ланцюзі мітохондрій; інтенсифікації синтезу та окиснення катехоламінів; активації системи ксантин-ксантинооксидаза [7]. При цьому АФК ініціюють вільно радикальні реакції (ВРР) перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), яким на сьогодні відведена значна роль у розвитку багатьох патологічних процесів [8]. Накопичення вільних радикалів у місці ураження призводить до оксидативного стресу, що спричиняє окиснення ліпідів, пошкодження ДНК та дезактивацію ферментів [7, 9]. Результати останніх досліджень свідчать про важливу роль активації каскаду реакцій запалення на розвиток основних ускладнень опікової рани [10–13]. Основну роль у продукції медіаторів запалення відіграють макрофаги. Надходження прозапальних цитокінів (ФНП- α , ІЛ-1, ІЛ-6) є важливим механізмом у розвитку гострої реакції на пошкодження. При цьому ФНП- α виконує роль пускового цитокіну, який призводить до каскаду вторинних цитокінів та гуморальних факторів, що в результаті призводить до виникнення місцевих та системних ускладнень [10].

Враховуючи вищезазначене, актуальним є створення нових лікарських препаратів, що мають антиоксидантні властивості і чинять достатню репаративну, протизапальну дію та мають високий показник безпечності [5, 7, 14].

Незважаючи на значну кількість представлених на фармацевтичному ринку препаратів для лікування ранового процесу, на сьогоднішній день проблема фармакологічної корекції опіків та їх ускладнень залишається актуальною і невирішеною. Саме тому на кафедрі заводської технології ліків Національного фармацевтичного університету під керівництвом професора Рубан О. А. була розроблена нова комбінована мазь, що містить сухий екстракт солодки голої, коензим Q10 та дигідрокверцетин (ДГК) (далі у тексті-мазь СКД). У раніше проведених дослідженнях нами для мазі СКД була встановлена наявність фотопротекторної та протизапальної активності [15].

Мета – дослідження репаративних властивостей комбінованої мазі СКД на моделі термічного опіку воском у щурів.

Матеріали і методи

В експерименті було використано 20 білих безпородних щурів масою 260–300 г. Тварин було поділено на 4 групи по 5 тварин у кожній: 1-ша група – контрольна (тварини із природним загоєнням); 2-га – тварини, які лікували маззю СКД; 3-тя – тварини, яких лікували маззю, що містить рутин, коензим Q10 та екстракт солодки (надалі - мазь СКР); 4-та – тварини, яким наносили мазь метилурацилову (препарат порівняння), що є аналогом за лікарською формою, фармакологічною дією і показаннями до застосування.

Поверхневі опіки відтворювали за методикою Bairy KL [16]. Тваринам під кетаміновим (100 мг/кг) наркозом видаляли шерсть з одного боку. На депільовану ділянку шкіри накладали трафарет із площею вікна 4 см². Опік IIIA ступеня відтворювали при заповненні трафаретного вікна воском, підігрітим до 80 °С, після застигання трафарет знімали разом із залишками воску. У продовж усього експерименту тварини перебували на стандартному раціоні та в стандартних умовах віварію відповідно до санітарно-гігієнічних норм [17].

Лікування розпочинали через 24 години після моделювання опіку і продовжували 1 раз на добу до повного загоєння. Мазі наносили тонким шаром на уражену поверхню. Ефективність лікування оцінювали на 3-тю, 5-ту, 7-му, 9-ту, 12-ту, 15-ту, 18-ту та 21-шу добу за допомогою планіметричних показників, що

передбачали: площу опіку (S , мм^2), період епітелізації (день відторгнення струпа, в середньому в групі) та ступінь загоєння рани (%), який розраховували за формулою [17]:

$$\text{Ступінь загоєння} = \frac{\text{Початкова площа опіку} - \text{Площа опіку відповідної доби}}{\text{Початкова площа опіку}} \times 100\%$$

Усі втручання та евтаназія тварин проводилися згідно з біоетичними нормами поводження з лабораторними тваринами (Страсбург, 1986) та I Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали на персональному комп'ютері Pentium III за допомогою програми «Statistica 6», використовуючи t-критерій Стьюдента для порівняння незалежних вибірок при рівні вірогідності $p \leq 0,05$ [18].

Результати та їх обговорення

Після відтворення опікової травми IIIA ступеня у щурів утворився щільний струп коричневого кольору з чітко окресленими краями зони некрозу та запальними змінами оточуючих тканин. На мал. 1 зображено стан пошкодженої ділянки шкіри тварин на 5-й та 10-й дні експерименту [2].

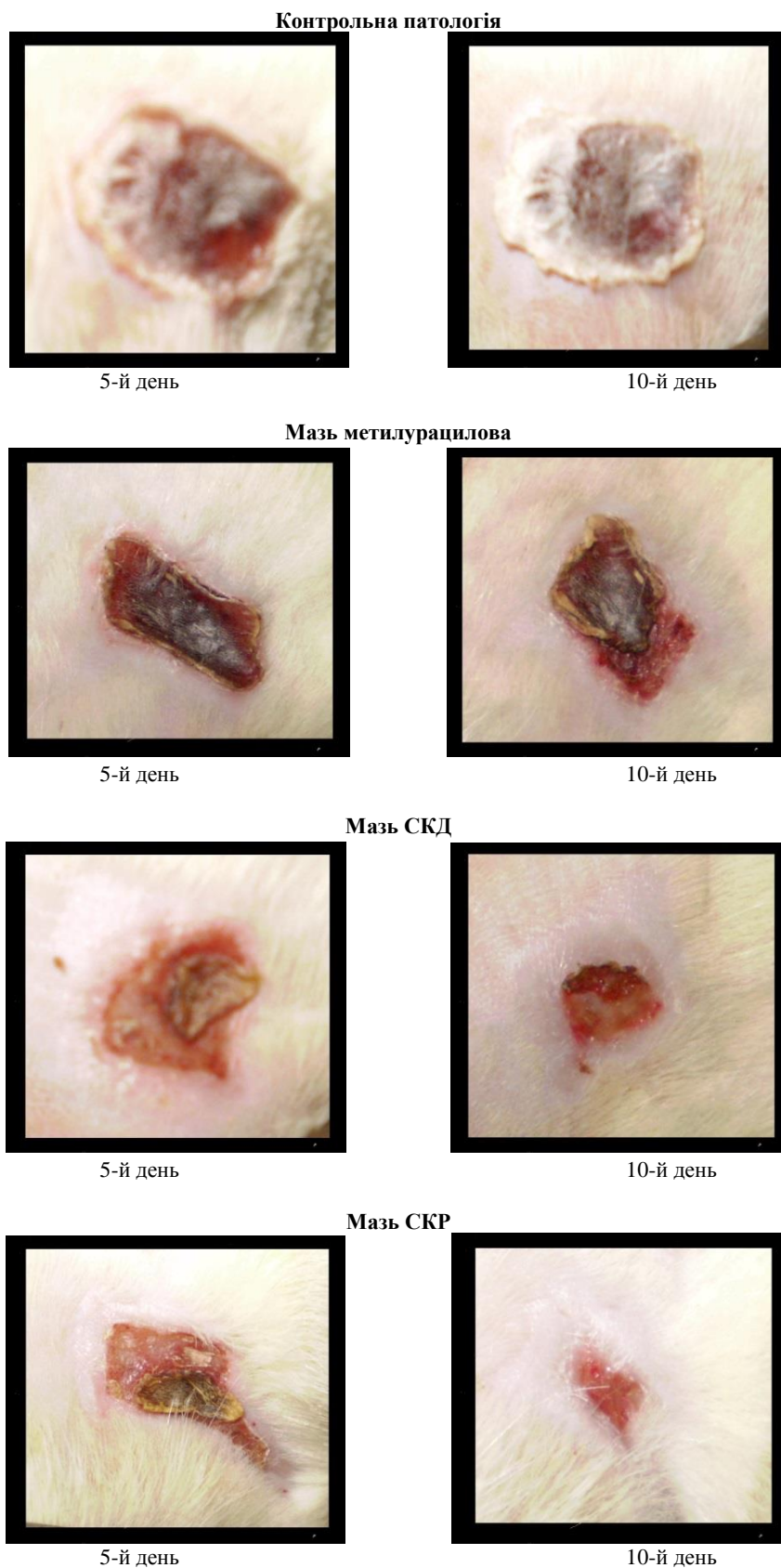
При застосуванні мазей СКД та СКР загоєння відбувалося значно швидше. Так, при нанесенні мазі СКД на уражену ділянку тварин відторгнення струпа почалося з 9-ї доби дослідження та в середньому по групі становило 14,8 дня, що на 31,5 % менше, ніж у групі контрольної патології ($p \leq 0,05$), та на 28,1% менше, ніж в групі тварин, яким наносили мазь метилурацилову ($p \leq 0,05$) (табл. 1). У тварин, яким наносили мазь СКР, період епітелізації становив 17,2 дня, та був достовірно нижчим, ніж у групі контрольної патології (менше на 20,4 %, $p \leq 0,05$) і порівняно з референс-препаратом (менше на 16,5 %, $p \leq 0,05$) (табл. 1). При цьому період епітелізації при нанесенні мазі СКД був меншим, ніж для мазі СКР, проте достовірних відмінностей не виявлено. Таким чином, отримані результати свідчать, що мазі СКД та СКР сприяли скороченню термінів загоєння ран на 6,8 та 4,4 дня відповідно порівняно з контрольною патологією ($p \leq 0,05$) (табл. 1).

Дослідження планіметричних показників у щурів, яких лікували експериментальними мазями СКД та СКР, метилурациловою маззю, а також у групі тварин, яких не лікували наведені в табл. 2. Прискорення загоєння та достовірне

зменшення площі опіків під впливом мазі СКД спостерігали, починаючи із 3-го і по 18-й день, а під впливом мазі СКР, – із 7-го по 18-й день щодо контрольної патології ($p \leq 0,05$) (табл. 2). Мазь метилурацилова також прискорювала загоєння та скорочувала площу опікової рани, проте достовірних відмінностей по відношенню до групи контрольної патології не було виявлено (табл. 2).

При порівнянні із референс-препаратом, ступінь загоєння в групі тварин, яких лікували маззю СКД, був достовірно вищим уже із 3-го дня експерименту, а у групі тварин, яких лікували маззю СКР, починаючи з 9-го дня ($p \leq 0,05$) (табл. 2). Достовірних відмінностей між маззю СКД та СКР у ході дослідження не було виявлено (табл. 2). Повне загоєння ран у групі тварин, яким наносили мазь СКД, відбулося на 18-ту добу експерименту; СКР – на 21-шу добу, а при застосуванні метилурацилової мазі на 21-шу добу дослідження повного загоєння не спостерігалося (табл. 2).

Відсоток загоєння на 18-й день при застосуванні мазей СКД та СКР був вищим на 9,7 та 6,9 % відповідно, ніж у групі тварин, яких не лікували ($p \leq 0,05$). Необхідно зазначити, що на 18-й день експерименту ступінь загоєння під впливом метилурацилової мазі був на 2,3 % вищим порівняно з контрольною патологією, проте достовірних значень не набув (рис. 2). Таким чином, вивчення планіметричного аналізу ранового процесу, викликаного термічним опіком, показало, що в усіх групах тварин, яких лікували, спостерігали прискорення загоєння ран та відсутність їх нагноєння. При місцевому застосуванні мазей СКД та СКР спостерігали прискорення епітелізації та відторгнення струпа. Найбільш швидке загоєння опікових дефектів відбулося під час лікування маззю СКД. Необхідно зазначити, що достовірної різниці в ефективності мазей СКД та СКР виявлено не було. Результати експерименту показали, що репаративні властивості мазей СКД та СКР (за показником ступеня загоєння та площею рани) були вищими, ніж у препарату порівняння – метилурацилової мазі. В середньому ступінь загоєння рани при нанесенні мазі СКД був на 20,3 %, мазі СКР – на 12,6 %, а метилурацилової мазі – на 4,8 % вищим, порівняно із нелікованим контролем.



Мал. 1. Динаміка загоєння опікових уражень шкіри щурів при нанесенні досліджуваних мазей та в групі тварин, яких не лікували. Примітки: 1.СКД – мазь на основі дигідрокверцитину, коензиму Q10 та екстракту солодки; 2. СКР – мазь на основі рутину, коензиму Q10 та екстракту солодки

Таблиця 1

Вплив досліджуваних мазей на строки епітелізації (відторгнення струпа) при опікових ураженнях шкіри (M ± m; n = 5)

Експериментальна група	Кількість днів
Контрольна	21,6 ± 1,122
Мазь метилурацилова	20,6 ± 0,748
Мазь із дигідрокверцетином	14,8 ± 1,828 ^{*/@}
Мазь із рутином	17,2 ± 1,114 ^{*/@}

1) * – достовірно щодо контрольної патології (p ≤ 0,05); 2) @ – достовірно відносно референс-препарату (p ≤ 0,05)

Таблиця 2

Вплив досліджуваних мазей на ступінь загоєння на моделі термічного опіку воском у щурів (M ± m; n = 5)

Доба спостереження	Ступінь загоєння, %			
	Контрольна група	Мазь метилурацилова	Мазь з дигідрокверцетином	Мазь з рутином
3-тя доба	37,1 ± 4,161	35,15 ± 2,371	48,4 ± 2,242 ^{*/@}	37,1 ± 6,578
5-та доба	42,6 ± 5,412	50,1 ± 4,635	63,5 ± 4,12 ^{*/@}	53,15 ± 10,866
7-ма доба	44,7 ± 5,412	56,4 ± 4,608	78,4 ± 4,34 ^{*/@}	64,4 ± 7,364 [*]
9-та доба	56,1 ± 4,936	64,2 ± 4,551	89,2 ± 3,628 ^{*/@}	80,3 ± 6,461 ^{*/@}
12-та доба	63,95 ± 4,201	72,7 ± 3,266	96,0 ± 1,696 ^{*/@}	87,3 ± 4,529 ^{*/@}
15-та доба	78,25 ± 4,213	80,4 ± 2,416	98,2 ± 0,8 ^{*/@}	92,75 ± 3,387 ^{*/@}
18-та доба	90,3 ± 2,889	92,6 ± 1,6	100 ± 00 ^{*/@}	97,25 ± 1,696 ^{*/@}
21-ша доба	98,4 ± 1,03	98,15 ± 1,244	100 ± 00	100 ± 00

1) * – достовірно щодо контрольної патології (p ≤ 0,05); 2) @ – достовірно щодо референс-препарату (p ≤ 0,05)

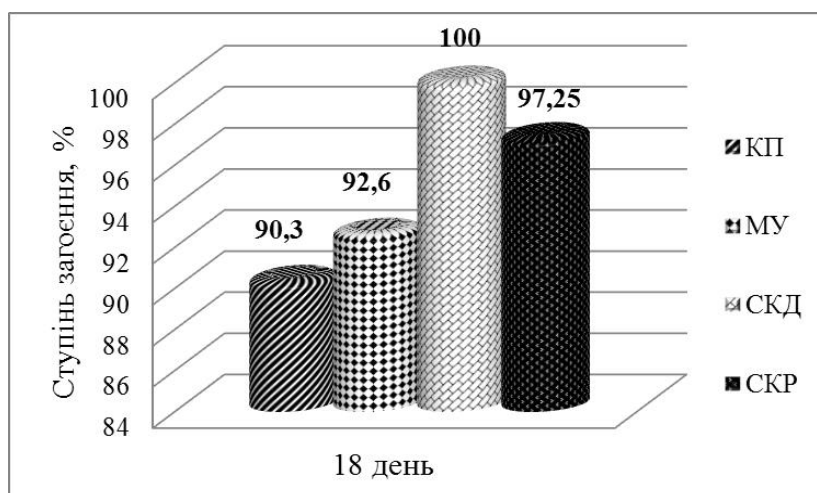


Рис. 2. Ступінь загоєння в експериментальних групах на 18-й день експерименту (%; n = 5): КП – контрольна патологія; МУ – мазь метилурацилова; СКД – мазь на основі дигідрокверцетину, коензиму Q10 та екстракту солодки; СКР – мазь на основі рутину, коензиму Q10 та екстракту солодки

Аналізуючи вищезазначене, можна припустити, що більш виразна репаративна активність мазі СКД обумовлена синергічним впливом компонентів мазі. Так, Man Hee Rhee *et al.* установили здатність флаваноїдів, зокрема дигідрокверцитину та рутину, пригнічувати ядерний фактор транскрипції NF- κ B та AP-1, що призводить до пригнічення експресії ІЛ-1 та ІЛ-6 та зниження запальної реакції [9]. У свою чергу, Bodet C. *et al.*, вивчаючи екстракт солодки, виявили його значний протизапальний ефект завдяки пригніченню вивільнення ІЛ-1 β та ІЛ-6, а також ФНП- α гіперреактивними макрофагами [19]. Mellors A. *et al.* установили, що коензим Q10 не впливає на продукцію ІЛ-1 та ІЛ-6, проте здатний суттєво знижувати секрецію ФНП- α , а підвищення дози коферменту Q10 призводило до зниження рівня ІЛ-2 [20].

Таким чином, враховуючи дані літератури, можна припустити, що компоненти досліджуваних мазей, діючи синергічно на декілька ланок патофізіологічного процесу опікової рани, призводять до зменшення пошкоджувальної дії вільних радикалів у місці ураження, зменшують запалення та прискорюють репаративні процеси в організмі.

Висновки

1. На моделі термічного опіку воском встановлено, що при застосуванні мазей СКД та СКР період епітелізації зменшився відповідно на 6,8 та 4,4 дня порівняно із контрольною патологією. У середньому ступінь загоснення рани при нанесенні мазі СКД був на 20,3 %, мазі СКР – на 12,6 %, а метилурацилової мазі – на 4,8 % вищим, порівняно із нелікованим контролем.
2. Репаративна дія мазей СКД і СКР обумовлена синергічним впливом їх компонентів, що завдяки антиоксидантним властивостям зменшують пошкоджувальну дію вільних радикалів у місці ураження, знімають запалення та прискорюють репаративні процеси в організмі.
3. Мазі СКД та СКР чинять виразну ранозагоювальну дію та за ефективністю не поступаються препарату порівняння, що робить їх перспективними препаратами для подальшого фармакологічного дослідження з метою впровадження у клінічну практику.

References (список літератури)

1. Gerych ID, Makar DA, Sachin VS. *Termichni opiky* [Thermal burns]. Lutsk: Galitska spilka Publ., 2000. 32 p.
2. Fistal YeYa, Kozinets GP, Samoilenko GYe. *Kombustologiya* [Combustology]. Donetsk. 2006. 240 p.
3. Tkacheva OV, Butko YO. The dynamics of the level cytokines and inflammatory markers in rats third-degree burn trauma under influenced by wound-healing medications. *European Applied Sciences*. 2013;3:61–64.
4. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. [The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms](#). *J Int Med Res*. 2009;37(5):32–39.
5. Hunt TK, Hopf H, Hussain Z. Physiology of wound healing. *Adv Skin Wound Care*. 2000;13(2 Suppl):6–11
6. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. [NAD\(P\)H oxidase: role in cardiovascular biology and diseases](#). *Circ Res*. 2000;86(5):494–501.
7. Tolstykh MP, Akhmedov BA, Ataev AR, Shin FYe, Parfenov AP. *Lechenie ran antioksidantami* [Treatment of wounds with antioxidants]. Makhachkala: Epokha Publ., 2004. 170 p.
8. Gaman DV, Kononenko NN, Altukhov AA. [Antiradical activity of inacsoril]. *Chelovek i lekarstvo: materialy XVIII Ros. naz. congressa*. [Proceeding of XVIII Russian National Congress on human and drug]. Moscow, 2011, pp. 428–429.
9. Rhee M-H, Endale M, Kamruzzaman SM, Lee W-M, Park H-J, Yoo M-J, Cho J-Y. Taxifolin inhibited the nitric oxide production and expression of pro-inflammatory cytokine mRNA in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *Journal of experimental and biomedical sciences*. 2008;14(3):147–155.
10. Cakir B, Yegen BC. [Systemic responses to burn injury](#). *Turk J Med Sci*. 2004;34(4):215–226.
11. Diegelmann RF, Evans MC. [Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing](#). *Frontiers in Bioscience*. 2004;9:283–9.
12. Kataranovski M, Magic Z, Penjnovic N. [Early inflammatory cytokine and acute phase protein response under the stress of thermal injury in rats](#). *Physiol Res*. 1999;48(6):473–82.

13. Ravage ZB, Gomez HF, Czermak BJ, Watkins SA. Mediators of microvascular injury in dermal burn wounds. *Inflammation*. 1998; 22(6):619-629
14. Plotnikov MB, Tiukavkina NA. *Lekarstvennyye sredstva na osnove dikverina* [Diquerin-based medications]. Tomsk: Tomsk University Publ., 2005. 228 p.
15. Tsulun OV, Gaman DV, Derymedvid LV. [Efficacy of a new combined ointment with dihydroquercetin, coenzyme Q10 and licorice extract on UV-erythema in rats]. *Problems of Ecological and Medical Genetics and Clinical Immunology*. 2013;5(119):262–272.
16. Bairy KL, Rao CM. An experimental model to produce partial thickness burn wound. *Indian J Exp Biol*. 1997;35(1):70–72.
17. Stefanov OV. *Doklinichne doslidzhennia likarskikh zasobiv: metodychni rekomendatsii* [Preclinical study of drugs: methodological recommendations]. Kyiv: Avitsena Publ., 2001. 528 p.
18. Halafian AA. STATISTICA 6. *Statisticheskiy analiz dannykh* [STATISTICA 6. Statistical analysis of data]. Moscow: Binom-Press Publ., 2007. 512 p.
19. Bodet C, Gafner S, Bergeron C. A licorice extract reduces lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine secretion by macrophages and whole blood. *J Periodontol*. 2008;79(9):52–61.
20. Mellors A, Tappel A. The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol. *J Biol Chem*. 1966;241(19):4353–6.

(received 30.07.2014, published online 15.10.2014)

(отримано 30.07.2014, опубліковано 15.10.2014)

