

БИОХИМИЯ

УДК 619:616

М. М. Казанджян, Г. В. Гаспарян, Г. С. Мкртчян, В. О. Топузян

Исследование репаративной активности N1-фенил-2-{5-оксо-2-фенил-4-[(Z)-1-фенилметилиден]-4,5-дигидро-1H-имидазолил}-ацетамида в условиях экспериментального ожога

(Представлено академиком К.Г. Карагезяном 26/ХІІ 2008)

Ключевые слова: *ожоги, воспаление, 5-имидазолонны, репаративная активность, гистология*

Изучение поражений при ожоговой болезни не может ограничиваться только исследованием изменений, происходящих в коже и подлежащих тканях. С момента ожога вследствие раздражения рецепторов кожи и последующего непрерывного потока афферентных импульсов в болезненный процесс вовлекается центральная нервная система (ЦНС). Из обожженных тканей в кровь всасываются продукты распада. Вследствие ожога ткани теряют воду и белки, что способствует истощению органов, а иногда приводит организм к смерти [1].

В некротизированных тканях появляется огромное количество микробов, скопление которых может быть обнаружено в гистологических срезах даже при малом увеличении микроскопа. В подкожной клетчатке околораневой области наблюдаются дистрофические, некробиотические и некротические изменения.

Современные методы обработки поверхности ожога различными лекарственными средствами в значительной степени ограничивают разведение микрофлоры, усиливая регенерацию эпителиального покрова кожи, где задерживаются процессы гниения, что приводит к формированию сухого струпа [2]. Для этого применяют разные влажно-высыхающие повязки йодоформов, представляющие собой соединения йода с поливинилпирролидином.

В другой стадии раневого процесса – регенерации и отторжения струпа лечение должно быть направлено на создание благоприятных условий для созревания грануляции. С этой целью используют мазевые повязки с антимикробным и ранозаживляющим действием (2% фурацилиновая мазь, метилдиоксидин, винилин, мазь Вишневского и др.) [3]. Вместе с тем, учитывая разновидности ожоговой болезни, изучение и изыскание новых эффективных ранозаживляющих средств и их внедрение в медицинскую практику довольно актуально.

Известно, что некоторые производные имидазолин-5-онов проявляют противовоспалительные свойства [4], что и привело нас к изучению репаративной активности аналогов этих соединений в условиях экспериментального ожога.

В качестве потенциального ранозаживляющего средства при ожоговой болезни в эксперименте был использован новый аналог имидазолин-5-она N1-фенил-2-{5-оксо-2-фенил-4-[(Z)-1-фенилметилен]-4,5-дигидро-1H-1-имидазолил}-ацетамид (далее I), синтез которого описан в [5]. Изучены противовоспалительные и ожогозаживляющие свойства I при ожоговой болезни, где воспалительными факторами являлись травмы эпидермиса и легкие химические ожоги. Репаративная активность I изучалась на модели острого химического ожога задних бедер крыс, индуцированного ксилолом [6].

Целью настоящего исследования являлось установление особенностей влияния I на течение и динамику фазового развития ожоговой раны в различные сроки эксперимента (спустя 24, 48, 96 ч).

В соответствии с поставленными задачами эксперимента животных разделили на следующие группы по 6 в каждой: 1) интактная; 2) контрольные животные (спустя 24, 48, 96 ч после ожога, правое бедро); 3) подопытные животные (спустя 24, 48, 96 ч после ожога пораженные участки обрабатывали 10 % мазью I, левое бедро); 4) подопытные животные (спустя 24, 48, 96 ч, после ожога пораженные участки обрабатывали 20 % мазью I, левое бедро). Все группы содержались в одном помещении, на едином пищевом рационе.

Оба бедра животного тщательно очищались от волосяного покрова, приблизительно на 1 см² так, чтобы была поражена эпидермальная часть и частично дерма кожи. Животные всех групп (очищенные участки) подвергались аппликации х. ч. ксилолом. Правые бедра крыс 3-й и 4-й групп были обработаны ланолином в качестве контроля. Левые бедра лечили мазью, содержащей 10 и 20 % I. После завершения каждого этапа эксперимента во всех группах макроскопически оценивали уровень заживления раневой поверхности, а также развитие регенерационных и дисрегенерационных

процессов в исследуемых отделах кожи.

Животных каждой группы в соответствующие сроки под наркозом забивали с помощью лабораторной гильотины. Оценка морфофункционального состояния кожи в данном эксперименте базировалась на результатах общеморфологического анализа эпидермиса и дермы кожи.

Гистологические исследования проводили на серийных микротомных срезах, окрашенных общепринятыми и специальными морфологическими методами. Для предварительной оценки общего морфофункционального состояния кожи полученные срезы окрашивались гематоксилином-эозином по методу Ван Гизона [7]. Кроме того с помощью окулярной измерительной сетки Автандилова была определена динамика изменений ядро-цитоплазматического коэффициента (ЯЦК). Подсчитав количество точек (1000), приходящихся на ядро, а затем на цитоплазму клеток эпидермиса и дермы кожи и взяв их соотношение, получили соответствующий индекс для каждой клетки кожи [8]. Следует упомянуть, что такая характеристика состояния эпидермоцитов и меланоцитов кожи при химических ожогах в литературе не представлена. Все полученные в работе количественные данные подвергались статистической обработке по методу Фишера – Стьюдента.

Известно, что под влиянием различных вредных факторов на поверхностных частях кожи развиваются разные патологические процессы, приводящие к развитию воспалительных реакций кожного покрова [9,10].

В нашем эксперименте были созданы модели легкого химического ожога, который по своей характеристике приближается к ожогу первой степени. При этом химическому ожогу подвергались поверхностные слои эпидермального покрова и частично дермы кожи.

Гистологические исследования показали, что спустя 24 ч после ожога у животных как контрольной, так и подопытных групп в коже наблюдаются заметные расширения капилляров. В эпидермисе обожженная поверхность становится пропухшей и гиперемированной, с явно выраженными отеками. Отмечается появление серозного экссудата. Эпидермис наполнен очагами лимфогистиоцитарной инфильтрации с наличием экссудата. Кровеносные сосуды расширены и полнокровны. Воспалительные процессы в эпителиальном слое эпидермиса характеризуются появлением экссудата под струпом.

По сравнению с предыдущим сроком спустя 48 ч после ожога в раневой ткани кожи отмечается увеличение количества лимфоидных элементов. Усиливаются процессы деструктивных изменений. Часто встречаются клетки с отсутствием ядра. Кожные железы местами окружены лимфоидными элементами, которые достигают базального слоя эпидермиса. Сосуды расширены и заполнены эритроцитами (стаз). Под струпом наблюдается

кровоизлияние ткани и отечность.

Вышеуказанные нарушения заметно усиливаются спустя 96 ч с начала эксперимента. Помимо нарушений многослойного характера эпидермиса нарушаются также сосочковая и сетчатая формации дермы. Выявляются многочисленные лимфоидные элементы с наличием экссудата. Эпидермоциты и меланоциты часто подвергаются некрозу и кровоизлиянию. Прогрессируют процессы лимфогистоцитарных инфильтраций. По сравнению с предыдущим сроком дистрофические и деструктивные изменения прогрессируют, достигая максимума (рис. 2).

Следует отметить, что наряду с выявленными многочисленными нарушениями в кожной ткани крыс в этом сроке эксперимента местами наблюдаются очаги субституционных репаративных регенераций.

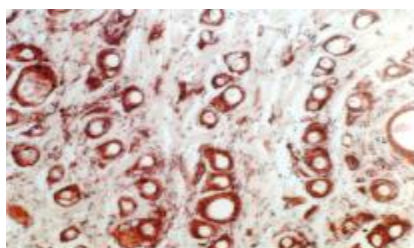


Рис. 1. Участок кожи животного интактной группы, окрашенный гем. эозином.

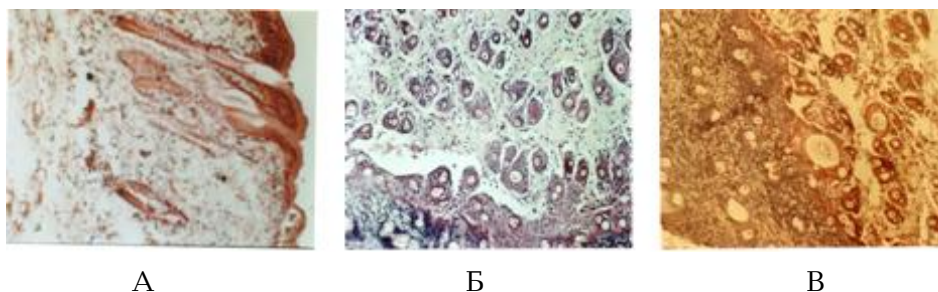


Рис. 2. Участки кожи животных контрольной группы спустя 24 (А), 48(Б), 96 (В) ч после ожога.

Описанные патологические изменения дали нам возможность апробировать I в виде 10 и 20 % мази в качестве ожого-ранозаживляющего средства, а также степень репаративной и противовоспалительной активности этого вещества. На фоне влияния мази, содержащей 10 и особенно 20 % I, вышеуказанные патологические процессы умеренно подавляются.

Начиная с 1-х суток лечения животных указанным средством наблюдается уменьшение кожных ожоговых реакций. В этом сроке эксперимента под влиянием 10% мази хоть и наблюдается тенденция развития субституционной регенерации, но местами также участки превращаются в воспалительные очаги экссудативного характера. Интересно отметить, что под воздействием 20% мази на 2-е сутки эксперимента намечаются восстановительные процессы

структуры сетчатых и сосочковых слоев. Умеренно уменьшаются количество и площадь деструктивных очагов (рис. 3).

Если у контрольной группы (спустя 48 ч после ожога) почти у всех животных оставались участки незаживших ран, то у животных, которые получали предлагаемое средство, выявилась активация процессов регенерации. Заметно восстанавливаются клеточные элементы кожи, в некоторых местах хорошо защищены ядра меланоцитов. Наблюдается формирование коллагеновых волокон сетчатого слоя дермы. Визуально уменьшается площадь ожоговой поверхности. Наряду с возникновением процессов реституционных регенераций в некоторых областях кожи выявляются очаги некротического характера, а также участки кровоизлияния.

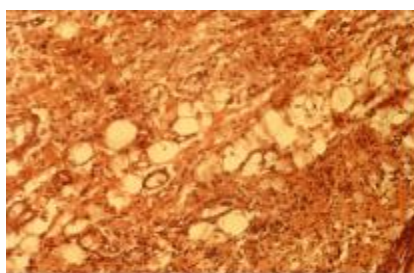


Рис. 3. Участок кожи животного экспериментальной группы при применении 10% мази I спустя 48 ч после ожога.

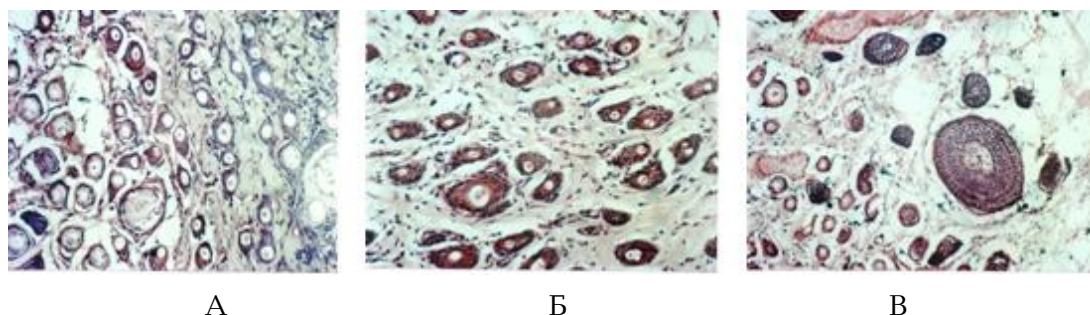


Рис 4. Участки кожи животных экспериментальной группы при применении 20% мази I спустя 24 (А), 48 (Б), 96 (В) ч после ожога.

Иная гистологическая картина кожи выявляется на 4-й день эксперимента. По сравнению с предыдущим сроком процесс регенерации кожи под воздействием 20 % мази проходил значительно быстрее. Воспалительные процессы менее выражены, чем в контрольной ситуации. Образуется грануляционная ткань, которая постепенно заполняет раневую часть, наблюдается отторжение струпа и эпителизация раневой поверхности. Почти полностью восстанавливается количество клеточных элементов, форма и структура эпидермоцитов и меланоцитов приближаются к норме. По всей поверхности кожи доминирует картина репаративной реституционной регенерации. Наряду с восстановлением сетчатого слоя инфильтративные,

деструктивные и дистрофические очаги в дерме достигают минимума (рис. 4.). На фоне влияния 20% I на эпидермисе отмечается образование демаркационного вала, с последующим формированием грануляционной ткани, восстановление кожной ткани.

Достоверность приведенных гистологических данных подтверждают полученные нами морфометрические данные при определении ЯЦК. Цитометрические исследования показывают, что ЯЦК у "нелеченых" крыс имеет тенденцию к уменьшению, а на фоне влияния 20% мази этот показатель приближается к норме (таблица). Заметно уменьшаются процессы каротикноза и кариолиза, что приводит к увеличению ЯЦК.

Ядро-цитоплазматический коэффициент дермы животных в эксперименте

Группа	24 ч	48 ч	96 ч
Интакт	27.6±0.002	27.6±0.002	27.6±0.002
Контроль	15.2 ±0.05	13.6±0.05	12.2±0.04
Основа	16.3 ±0.003	15.7±0.05	15.8 ± 0.006
10 % I	18.2 ±0.09	17.1±0.004	16.1± 0.07
20 % I	19.6 ±0.04	20.7 ±0.003	22.6 ±0.05

Целесообразность использования карио- и цитометрии диктуется тем, что эти показатели позволяют судить о метаболическом состоянии клеток, поскольку ядро является важнейшим индикатором клеточной функции [11].

Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии НАН РА

М. М. Казанджян, Г. В. Гаспарян, Г. С. Мкртчян, В. О. Топузян

Исследование репаративной активности N1-фенил-2-{5-оксо-2-фенил-4-[(Z)-1-фенилметилиден]-4,5-дигидро-1H-имидазолил}-ацетамида в условиях экспериментального ожога

Установлено, что в условиях экспериментального ожога N1-фенил-2-{5-оксо-2-фенил-4-[(Z)-1-фенилметилиден]-4,5-дигидро-1H-имидазолил}-ацетамид в виде 20%-ной мази проявляет репаративные свойства. Длительное воздействие (до 96 ч) этим веществом приводит к интенсификации репаративных процессов. Выявлено, что указанное соединение может привести к частичному восстановлению гистоструктуры кожи.

Մ. Մ. Ղազանջյան, Ն. Վ. Գասպարյան, Գ. Ս. Մկրտչյան, Վ. Օ. Թոփուզյան
N1-Ֆենիլ-2-{5-օքսո-2-ֆենիլ-4[(Z)-1-ֆենիլմեթիլիդեն]-4,5-դիհիդրո-1H-իմիդազոլիլ}-
ացետամիդի ռեպարատիվ ակտիվության ուսումնասիրությունը էքսպերիմենտալ
այրվածքի պայմաններում

N1-Ֆենիլ-2-{5-օքսո-2-ֆենիլ-4[(Z)-1-ֆենիլմեթիլիդեն]-4,5-դիհիդրո-1H-իմիդազոլիլ}-ացետամիդի ռեպարատիվ ակտիվության ուսումնասիրությունները պարզեցին, որ էքսպերիմենտալ այրվածքների առկա-յության պայմաններում մեր կողմից ուսումնասիրված N1-Ֆենիլ-2-{5-օքսո-2-ֆենիլ-4[(Z)-1-ֆենիլմեթիլիդեն]-4,5-դիհիդրո-1H-իմիդազոլիլ}-ացետամիդը 20% բուրբի ձևով դրսևորում է լավ արտահայտված վիրավերականզոնդական հստակություններ:

Պարզվել է, որ նշված նյութի ազդեցության պայմաններում (20% բուրբ) էքսպերիմենտի առավել երկար ժամանակահատվածում (96 ժ.) ինքննսիվանում են ռեպարատիվ ռեզներացիայի պրոցեսները:

M. M. Ghazanjan, H. V Gasparyan., G. S. Mkrtchyan, V. O. Topuzyan
Investigation of Regenerative Activity of the N1-phenyl-2-{5-oxo-2-phenyl-4-[(Z)-1-
phenylmethylidene]-4,5-dihydro-1H-imidazolyl}-acetamide under Conditions of
Experimental Chemical Burns

The action of the N1-phenyl-2-{5-oxo-2-phenyl-4-[(Z)-1-phenylmethylidene]-4,5-dihydro-1H-imidazolyl}-acetamide on the experimental burnt has been researched. This compound in 20% ointement form shows well expressed rehabilitation qualities.

Литература

1. Гублер Е.В., Хребтобич В.И., Суббота А.Г. В сб: Термические ожоги и ожоговая болезнь. М. Медицина. 1973. С. 380.
2. Кочетыгов Н.И. Ожоговая болезнь. Л. Медицина. 1973.
3. Алексеев А.А., Попов С.В., Кузнецов В.Н. - Комбустииология. 2004. Т. 18. С. 197-203.
4. Kalpana P., Kalsi R., Bhalla T. N., Barthwall J. P. - Pharmazie. 1987. N 4. P. 269-272.
5. Топузян В.О., Казанджян М.М., Пароникян Р.В. - Хим. ж. Армении. 2008. Т. 61. N1. С. 73-78.
6. Hosseinzadeh H., Rahmi R. - Iran. J. Med. Sci. 1999. V. 24. P. 144-147.
7. Меркулов Г. А. Курс патологической техники. Л. Медицина. 1969.
8. Автандилов Г.Г. Введение в количественную патологическую морфологию. М. Медицина. 1973.
9. Zurier R.B. - Prost, Leuk, Essent, Fatty Acids. 1992. V. 48. P. 57-62.
10. Muthiah N.S., Vijayasekaran V. - Ind. J. Pharmak Sci. 1993. V. 55. P. 180-183.
11. Khasina E.I. Kirilenko L. A., Kirillov O. I. - Microscop. Anat. Forsch. 1986. V. 100. N3. P. 110-118.