

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ПИРИМИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПРИ МЕСТНОМ ЛЕЧЕНИИ ГНОЙНЫХ РАН МЯГКИХ ТКАНЕЙ (В ЭКСПЕРИМЕНТЕ)

УДК 615.014.42:616.74—002.3—08

Поступила 14.01.2011 г.



В.В. Бесчастнов, к.м.н., доцент¹;

С.Г. Измаилов, д.м.н., профессор¹;

А.А. Ботяков, к.м.н.¹;

А.Ю. Жаринов, к.м.н., врач-ординатор хирургического отделения²;

Д.А. Пантелеев, аспирант кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии³;

Н.Б. Мельникова, д.х.м., профессор, зав. кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии³; руководитель⁴

¹Городская клиническая больница №12, Н. Новгород;

²Главный клинический военный госпиталь ФСБ РФ, г. Голицино, Московская область;

³Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород;

⁴Испытательная лаборатория «Провизор», Н. Новгород

Цель исследования — оценка антиоксидантной активности Ксимедона в мягких лекарственных формах (мазях) в репаративном процессе заживления гнойных ран мягких тканей в эксперименте на собаках.

Материалы и методы. В I фазе раневого процесса в контрольной группе животных для лечения гнойной раны использовали мазь «Левомеколь», в основной группе — «Левоксиколь», содержащую Левомецетина — 0,75 г, Ксимедона — 4 г, полиэтиленоксида с мол. массой 1500 (ПЭО-1500) — 19,05 г, ПЭО-400 — 76,2 г. Эффективность лечения оценивалась на основании субъективных (визуальная оценка состояния раны) и объективных (микробиологические, цитологические исследования, биохимический анализ, планиметрия) критериев. Для оценки окислительных процессов в паравульнарных тканях определяли активность ферментов каталазы и супероксиддисмутазы, активность перекисного окисления липидов (ПОЛ) (диеновые, триеновые конъюгаты и количество двойных связей).

Результаты. Окислительно-восстановительные процессы в паравульнарных тканях характеризовались максимальными значениями показателей ПОЛ до начала лечения, в разгар воспаления. В процессе лечения отмечалась тенденция к постепенной нормализации показателей и возвращению их к исходному уровню, при этом в основной группе, при лечении «Левоксиколем», эта тенденция была более выражена.

Улучшенные репаративные свойства мазей на основе Ксимедона можно объяснить главным образом повышением антиоксидантной активности супероксиддисмутазы и каталазы, что может быть обусловлено ролью Ксимедона как активатора ферментов и эндогенного антиоксиданта, образующегося в процессе его биотрансформации.

Ключевые слова: гнойная рана, Ксимедон, ферменты, антиоксидантная защита.

English

Antioxidant activity of pyrimidine derivatives in local treatment of septic wounds of soft tissues (in an experiment)

V.V. Beschastnov, PhD, Associate Professor¹;

S.G. Izmailov, D.Med.Sc., Professor¹;

A.A. Botyakov, PhD¹;

A.Y. Zharinov, PhD, Hospital-Physician, the Department of Surgery²;

D.A. Panteleev, Postgraduate, the Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy³;

N.B. Melnikova, D.Ch.Sc., Professor, Head of the Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy³; Chief⁴

¹City Clinical Hospital No.12, Nizhny Novgorod;

²General Clinical Hospital of FSS RF, Golitsino, Moscow region;

³Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod;

⁴Testing Laboratory "Provizor", Nizhny Novgorod

Для контактов: Бесчастнов Владимир Викторович, тел. моб. +7 904-390-56-82; e-mail: lancet2004@list.ru.

The aim of the study is to assess antioxidant activity of Xymedon in ointments in reparative process of septic wounds of soft tissues in the experiment on dogs.

Materials and methods. To treat septic wounds, in I phase of wound process in the control group of animals Laevomecolum ointment was used, in the main group — Levoxycol, containing Laevomycetin — 0.75 g, Xymedon — 4 g, polyethylene oxides with molecular weight 1500 (ПЭО-1500) — 19.05 g, ПЭО-400 — 76.2 g. **The effectiveness of treatment was assessed based on subjective (visual test of wound condition) and objective (microbiological, cytological investigations, biochemical test, planimetry) criteria.** To assess oxidative process in paravulnar tissues, there were determined the activity of the enzymes of catalase and superoxide dismutase, lipid peroxidation activity (diene, triene conjugates and the number of olefinic links).

Results. Oxidation-reduction processes in paravulnar tissues were characterized by maximum values of lipid peroxidation before the treatment, at the height of inflammation. In the course of treatment there was tendency for gradual results normalization and the return to their initial level, however, in the main group treated by Levoxycol the tendency was more expressed.

Improved repair characteristics of ointments based on Xymedon can be explained mainly by the increase of antioxidant activity of superoxide dismutase and catalase that can be due to Xymedon as an activator of enzymes and endogenic antioxidant resulting from the process of it biotransformation.

Key words: septic wound, Xymedon, enzymes, antioxidant protection.

Медикаментозные средства для лечения гнойных ран «под повязкой» широко распространены в повседневной хирургической практике [1, 2]. Основными требованиями, предъявляемыми к ним при лечении хирургической инфекции, являются высокая антиоксидантная, репаративная, противовоспалительная, антибактериальная активность при минимальной токсичности и гипоаллергенности [3, 4].

Одной из перспективных отечественных фармацевтических субстанций, отвечающей этому комплексу требований, является простой аналог пиримидиннуклеозидов — Ксимедон (гидроксиэтилдиметилдигидропиримидин). Ксимедон [1—(β-оксиэтил)-4,6-диметил-1,2-дигидро-2-оксипиримидин] как лекарственное средство (ЛС) в таблетированной форме внесен в Реестр лекарственных средств, разрешенных для применения в медицинской практике и к производству [3, 5].

Системное действие, главным образом как репаранта, препарата Ксимедона в таблетированной форме надежно доказано в практике. Прочие эффекты, в том числе антиоксидантная активность, а также свойства Ксимедона в других лекарственных формах, предполагающих местное действие, изучены менее детально. Во-первых, это связано с отсутствием на фармацевтическом рынке мягких и других лекарственных форм Ксимедона наружного применения. Во-вторых, высокая растворимость Ксимедона в воде (до 400 г/л) предполагает его низкую биоусвояемость при высокой биодоступности. Так, суточная потребность таблетированного Ксимедона составляет 1,0—1,5 г, а в мягких формах требуются его высокие концентрации (5—10%).

Цель исследования — оценка антиоксидантной активности Ксимедона в мягких лекарственных формах (мазях) в репаративном процессе заживления гнойных ран мягких тканей в эксперименте на собаках.

В задачи исследования входило:

1) изучение эффективности лечения мазями на основе Ксимедона и сравнительный анализ их с известными мягкими формами, содержащими Метилурацил, на основании субъективных (визуальная оценка состояния раны) и объективных (микробиологические, цито-

логические исследования, биохимический анализ, планиметрия) критериев;

2) исследование антиоксидантной активности каталазы и супероксиддисмутазы в процессах перекисного окисления липидов (ПОЛ) грануляционной ткани и паравульнарной области на расстоянии 1 см от края раны при лечении мазями на основе Ксимедона.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования проведены на 42 беспородных собаках массой 22,3±2,6 кг. Животные с моделированными гнойными ранами разделены поровну на две группы: контрольную и основную. В обеих группах лечение гнойной раны проводилось под повязкой. В I фазе раневого процесса в контрольной группе животных для лечения гнойной раны использовалась мазь «Левомеколь», в основной группе — мажевая форма «Левоксиколь». Для выявления различий в воздействии на раневую процесс исследуемых пиримидиновых производных Метилурацил в составе мази «Левомеколь» был заменен Ксимедоном при сохранении пропорций остальных компонентов. Таким образом, мазь «Левоксиколь» содержит Левомецетин — 0,75 г, Ксимедона — 4 г, полиэтиленоксидов с мол. массой 1500 (ПЭО-1500) — 19,05 г, ПЭО-400 — 76,2 г. Во II фазу раневого процесса применяли 10% мазь Ксимедона и 10% Метилурациловую мазь — лекарственные формы на вазелин-ланолиновой основе.

Эффективность лечения оценивалась на основании субъективных (визуальная оценка состояния раны) и объективных (микробиологические, цитологические исследования, биохимический анализ, планиметрия) критериев.

Материал для всех «инвазивных» методов исследования забирался одновременно: с участка здоровой ткани в месте моделирования гнойной раны, после нагноения моделированной раны (до лечения), на 3, 7, 11, 15 и 20-е сутки лечения. Иссекались грануляционная ткань и паравульнарная область на расстоянии 1 см от края раны. Для оценки окислительных процессов в паравульнарных тканях при лечении ран мазями на основе Ксимедона гомогенат ткани центрифугировали, полученный супернатант использовали для дальнейшего анализа: определяли активность ферментов каталазы

и супероксиддисмутазы (СОД), активность ПОЛ — диеновые, триеновые конъюгаты (ДК и ТК) и количество двойных связей.

Для оценки активности каталазы в тканевом экстракте применяли метод, основанный на способности пероксида водорода давать стойкое окрашивание с молибдатом аммония [6]. Активность СОД в тканевом экстракте определяли по методу, основанному на способности фермента ингибировать восстановление тетразолия нитросинего в присутствии феназинметасульфата и НАД-Н [7].

Интенсивность процессов ПОЛ оценивалась спектрофотометрически по содержанию ДК, ТК и количеству двойных связей в продуктах после экстракции липидов из полученного супернатанта в смеси хлороформ—метанол [8].

Для статистической обработки полученных данных использовалась компьютерная программа Statistica 6.0 [9]. Проверку нормальности распределения количественных признаков проводили с использованием критерия Колмогорова—Смирнова. Статистическую значимость оценивали: при сравнении качественных эффектов в парах распределений, применяя точный метод Фишера; при сравнении групп по количественному признаку — критерий Манна—Уитни для независимых выборок. Выборочные параметры обозначали: M — среднее, s — стандартное отклонение, Me — медиана, Q_1 — верхний квартиль, Q_3 — нижний квартиль, n — объем анализируемой подгруппы, p — величина статистической значимости различий. Критическое значение уровня значимости принималось равным 5% ($p \leq 0,05$).

Результаты и обсуждение. У всех животных после моделирования гнойной раны наблюдались все признаки местной хирургической инфекции: гнойное отделяемое из раны, отек, гиперемия кожи в области раны, локальное повышение температуры. Стенки и дно ране-

Оценка эффективности лечения гнойных ран ($Me [Q_1; Q_3]$)

Наблюдаемое явление	Основная группа (n=21)	Контрольная группа (n=21)	p
Грануляции, сут	3 [3; 6]	4 [3; 6]	0,04
Очищение раны, сут	5 [4; 8]	7 [5; 9]	0,04
Микробная обсемененность, КОЕ/мл (1-е сутки)	$2,8 \cdot 10^8$ [$2,9 \cdot 10^6$; $4,6 \cdot 10^9$]	$7,4 \cdot 10^8$ [$5,4 \cdot 10^8$; $4,3 \cdot 10^9$]	>0,05
Уменьшение площади раны, %	3-и сутки	81 [74; 87]	0,04
	7-е сутки	62 [59; 68]	0,003
	11-е сутки	25 [23; 28]	<0,001
Полное заживление, сут	$14,4 \pm 1,3$	$18,5 \pm 1,4$	<0,001

вого дефекта были покрыты фибринозно-гнойным налетом, отмечалась инфильтрация окружающих тканей.

В ходе лечения у животных обеих групп наблюдались однонаправленные изменения локального статуса — очищение ран от гноя и некрозов и заполнение их грануляционной тканью с одновременным исчезновением местных и регионарных признаков воспаления. Однако в основной группе по сравнению с контрольной отмечалось статистически значимое сокращение сроков грануляции и очищения раны (см. таблицу).

Эффективность заживления гнойных ран подтверждена микробиологическими и цитологическими исследованиями. Так, в 1-е сутки после моделирования ран микробная обсемененность раневого отделяемого была значительно выше критической. Цитологическая картина в эти же сроки соответствовала дегенеративно-воспалительному типу ответной реакции с преобладанием воспалительной реакции над альтеративной. Переход раневого процесса во II фазу проявлялся снижением количества микробных тел (до менее чем 10^5 /мл раневого отделяемого), регенераторным или регенераторно-воспалительным типом цитограммы.

На фоне проводимой терапии раневые дефекты сократились от исходной площади к 3-м суткам до 81% — в основной и до 89% — в контрольной группе, на 7-е сутки до 62% — в основной и до 68% — в контрольной. На 11-е сутки площадь раневой поверхности сократилась до 25% у животных основной группы и до 45% — контрольной. Полное заживление ран вторичным натяжением с образованием рубца у животных основной группы наблюдалось на $14,4 \pm 1,3$ сутки и на $18,5 \pm 1,4$ сутки — контрольной ($p < 0,001$).

Окислительно-восстановительные процессы в паравульнарных тканях характеризовались максимальными значениями показателей ПОЛ до начала лечения, в разгар воспаления. В процессе лечения отмечалась тенденция к постепенной нормализации показателей и возвращению их к исходному уровню, при этом в основной группе, при лечении «Левоксиколем», эта тенденция была более выражена.

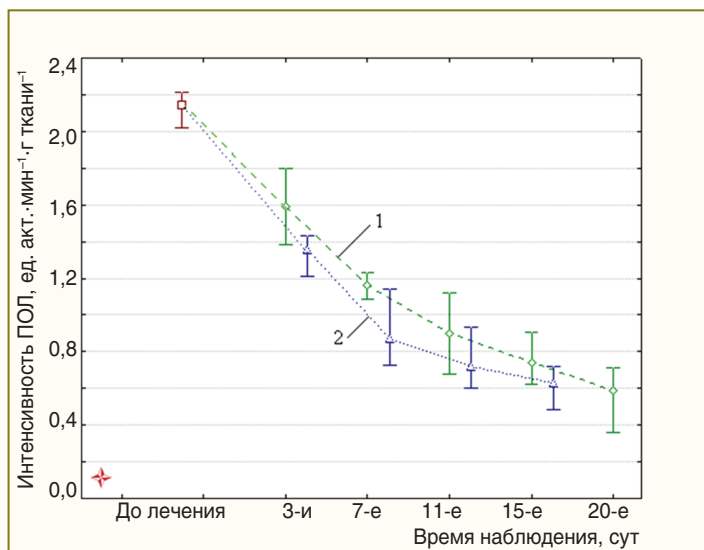


Рис. 1. Изменение показателей ДК при лечении гнойных ран различными мазевыми формами: * — здоровая ткань; 1 — «Левомеколь» в I фазу, Метилурацил — во II фазу раневого процесса; 2 — «Левоксиколь» в I фазу, Ксимедон — во II фазу раневого процесса

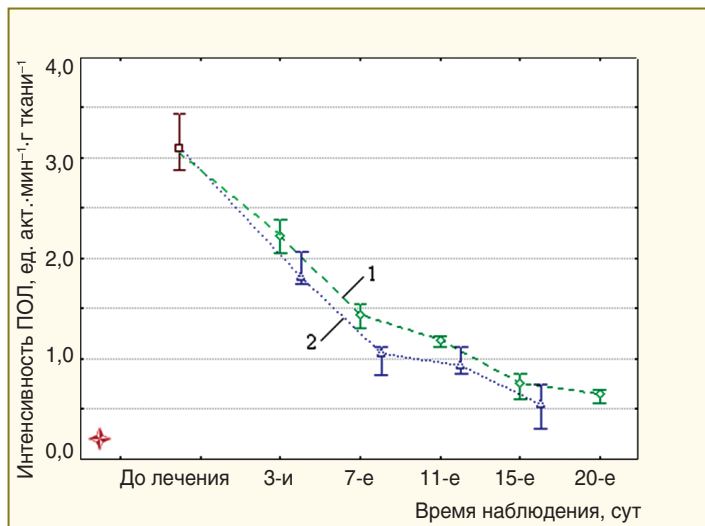


Рис. 2. Изменение количества двойных связей при лечении гнойных ран различными мазевыми формами: \star — здоровая ткань; 1 — «Левомеколь» в I фазу, Метилурацил — во II фазу раневого процесса; 2 — «Левоксиколь» в I фазу, Ксимедон — во II фазу раневого процесса

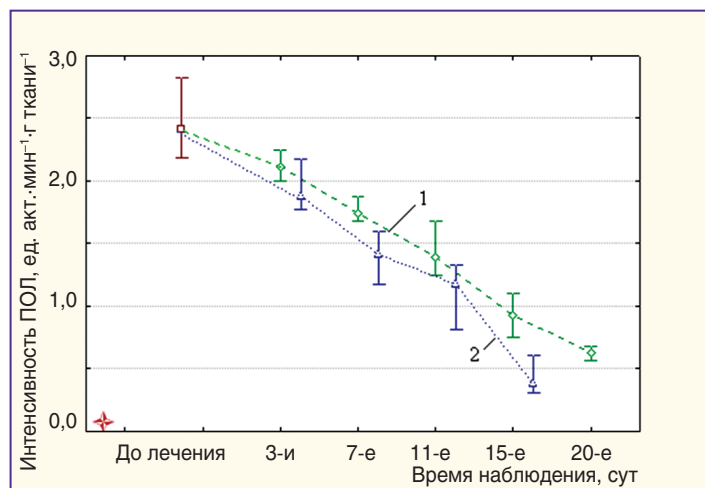


Рис. 3. Изменение показателей ТК при лечении гнойных ран различными мазевыми формами: \star — здоровая ткань; 1 — «Левомеколь» в I фазу, Метилурацил — во II фазу раневого процесса; 2 — «Левоксиколь» в I фазу, Ксимедон — во II фазу раневого процесса

Определение уровня ДК имеет особую ценность для оценки ПОЛ, поскольку отражает раннюю стадию окисления. Количество ДК существенно различается в I фазу раневого процесса на 3-и и 7-е сутки (рис. 1). На 11-е и 15-е сутки статистически значимых различий по этому признаку не выявлено, на 20-е сутки у большинства животных основной группы раны эпителизировались.

По признаку количества двойных связей в тканевом экстракте выявлены статистически значимые различия на 3-и сутки ($p=0,006$), на 7-е сутки ($p=0,004$), на 11-е сутки статистически значимая разница сохранялась ($p=0,01$), отмечалась она и на 15-е сутки лечения ($p=0,025$) (рис. 2).

По признаку содержания в паравульнарных тканях

ТК выявлены статистически значимые различия на 3-и сутки ($p=0,025$) и на 7-е сутки ($p=0,004$) (рис. 3). На 11-е и 15-е сутки лечения эти различия сохранялись ($p=0,016$ и $p=0,004$ соответственно).

Интенсивность ПОЛ более выражена в группе, получавшей в I фазу лечение мазью «Левоксиколь», а во II фазу — 10% мазью на основе Ксимедона.

Деструктивному воздействию ПОЛ противостоят мощная антиоксидантная система ферментов, наиболее значимыми из которых являются СОД и каталаза [10, 11]. В работе степень сохранности антиоксидантной защиты тканей паравульнарной зоны оценивали по их активности.

При сравнении групп, где в I фазу раневого процесса применялись мази «Левоксиколь» и «Левомеколь», по критерию активности СОД выявлены статистически значимые различия на 3-и сутки лечения ($p=0,037$) и на 7-е сутки ($p=0,016$) (рис. 4). Во II фазу раневого процесса (на 11-е и 15-е сутки лечения) различия оставались статистически значимыми ($p<0,001$).

Аналогичная динамика выявлена при сравнении групп по критерию активности каталазы. Так, в группах, где в I фазу раневого процесса применялись мази «Левоксиколь» и «Левомеколь», выявлены статистически значимые различия на 3-и сутки лечения ($p=0,02$) и на 7-е сутки ($p=0,01$). Во II фазу раневого процесса также выявлены различия — в группе, где применялась мазь на основе Ксимедона, активность каталазы была статистически значимо выше на 11-е и 15-е сутки лечения ($p=0,004$) (рис. 5).

Сравнение результатов исследования уровня антиоксидантной защиты по показателям активности каталазы и СОД паравульнарных тканей в разгар гнойного процесса и в процессе лечения гнойной раны свидетельствует о преимуществах использования мазей на основе Ксимедона по сравнению с традиционными.

Таким образом, анализ результатов лечения мазями на основе Ксимедона с использованием показателей контроля ПОЛ, а также активности каталазы и СОД позволяет сделать вывод о достоверном влиянии антиоксидантной активности Ксимедона на процесс заживления гнойных ран мягких тканей.

Антиоксидантное действие Ксимедона при приеме внутрь подтверждено в работах казанской школы [12]. Клиническими исследованиями показана роль Ксимедона как индуктора активности микросомальных оксидаз печени человека [13], что позволяет осуществить профилактику и лечение острых и хронических интоксикаций, стрептококковой ангины, гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области, вирусных гепатитов С, рожи на фоне базисной терапии [14].

Можно предположить, что механизм влияния Ксимедона в мазях на уровень антиоксидантной защиты по показателям активности СОД и каталазы пара-

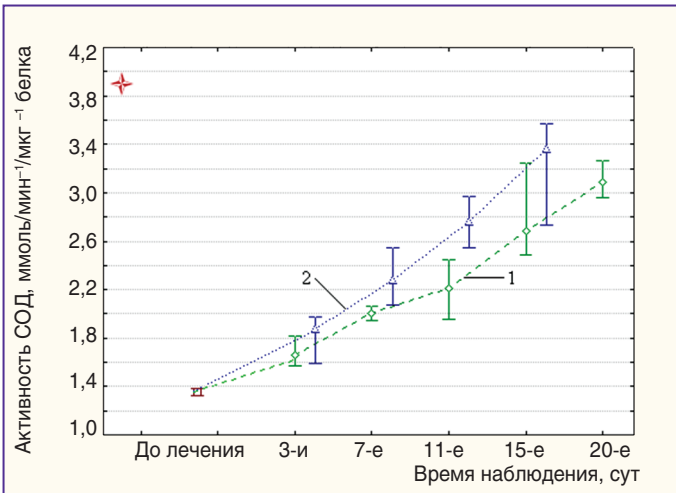


Рис. 4. Изменение активности супероксиддисмутазы при лечении гнойных ран различными мазевыми формами: \star — здоровая ткань; 1 — «Левомеколь» в I фазу, Метилурацил — во II фазу раневого процесса; 2 — «Левосиколь» в I фазу, Ксимедон — во II фазу раневого процесса

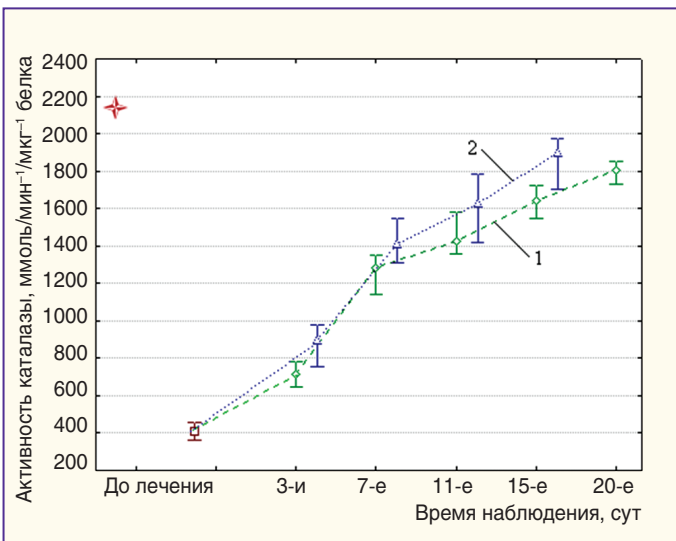
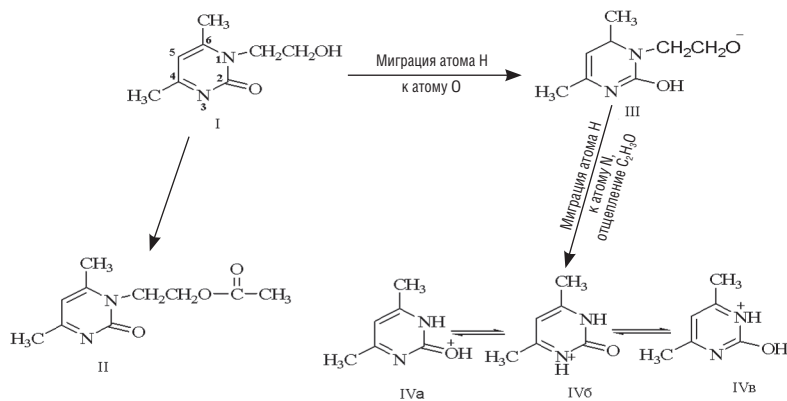


Рис. 5. Изменение показателей каталазы при лечении гнойных ран различными мазевыми формами: \star — здоровая ткань; 1 — «Левомеколь» в I фазу, Метилурацил — во II фазу раневого процесса; 2 — «Левосиколь» в I фазу, Ксимедон — во II фазу раневого процесса



Продукты распада Ксимедона в процессе биотрансформации

вulnerable тканей будет аналогичным, т.е. Ксимедон выступает как активатор или индуктор активности СОД и каталазы. В острой фазе раневого процесса каталитические центры ферментов СОД и каталазы ингибированы продуктами воспаления, вследствие чего удаление активных форм кислорода (например, супероксида) с образованием пероксида водорода и разложение пероксида водорода с выделением кислорода каталазой резко уменьшаются.

Роль Ксимедона как активатора ферментной активности СОД и каталазы, а также его влияние на процессы ПОЛ могут быть объяснены на основе анализа продуктов его биотрансформации в организме человека [15]. Предполагаемыми метаболитами Ксимедона (I) являются его ацильное производное по спиртовой группе (II) и продукты перегруппировки Мак-Лафферти (структуры IV) [16] (см. формулу).

Перегруппировке предшествует переход одного атома водорода этоксильной группы $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ к атому кислорода, что приводит к структуре III. Частицы типа III, представляющие собой енольную (лактимую) форму оксопиримидина, чрезвычайно реакционны в процессе биотрансформации, вступая в реакции фосфорилирования и ацилирования, а также выполняя функцию антиоксиданта. Кроме того, частицы III способны к захвату протона в водной среде, регулируя pH экссудата. В работах авторов [12, 15] отмечается, что некоторые метаболиты Ксимедона неустойчивы и в водной среде способны превращаться в Ксимедон.

Закключение. Микробиологические, цитологические, биохимические и планиметрические исследования убедительно показали, что местное лечение гнойных ран мягких тканей мазями на основе Ксимедона более эффективно по сравнению с традиционной схемой лечения с использованием «Левомеколя» и Метилурацила.

Улучшенные репаративные свойства мазей на основе Ксимедона обусловлены главным образом повышением антиоксидантной активности супероксиддисмутазы и каталазы, что может быть объяснено ролью Ксимедона как активатора ферментов и

эндогенного антиоксиданта, образующегося в процессе его биотрансформации.

Литература

1. *Блатун Л.А.* Флегмоны и абсцессы: современные возможности лечения. *Лечащий врач* 2002; 1: 30—40.
2. *Даценко Б.М.* Теория и практика местного лечения гнойных ран. Киев: Здоров'я; 1995; 384 с.
3. *Измайлов С.Г., Измайлов Г.А., Аверьянов М.Ю., Резник В.С.* Ксимедон в клинической практике. Н. Новгород: Изд-во НГМА, 2001; 188 с.
4. *Рябков М.Г.* Влияние антиоксидантов на детоксикационную функцию печени и лимфатической системы при остром перитоните. *Анн хир гепатол* 2003; 8(2): 343—344.
5. *Измайлов С.Г., Измайлов Г.А., Подушкина И.В., Логинов В.И.* Лечение ран. Казань: Изд-во Казан. гос. тех. ун-та; 2003; 292 с.
6. *Aebi H.* Catalase in vitro. In: *Methods in enzymatic analysis*. H.V. Bagmeyer (editor). 1974; Vol 2. p. 673—678.
7. *Nischikimi M., Roo A., Hagi K.* The occurrence of superoxide anion in the reactions of reduced phenaxide metasulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun* 1972; 146(2): 849—854.
8. *Ланкин В.З.* Ферментативное окисление липидов. *Укр биохим журн* 1984; 56(3): 317—331.
9. *Реброва О.Ю.* Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М: МедиаСфера; 2006; 312 с.
10. *Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г.* Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты. *Успехи химии* 1998; 52(9): 540—558.
11. *Владимиров Ю.А.* Свободные радикалы и антиоксиданты. *Вестник РАМН*.1998; 7: 43—47.
12. *Погорельцев В.И., Терещенко В.Ю., Чиркин А.А. и др.* Антиоксидантная активность ксимедона в комплексном лечении хирургических инфекций. *Каз мед журн* 2005; 86(4): 346—347.
13. *Погорельцев В.И., Гармонов С.Ю., Резник В.С. и др.* Ксимедон в качестве индуктора активности микросомальных оксидаз печени человека. Патент РФ №2316327. 2008.
14. *Жарёхина А.В.* Биофармацевтический анализ метаболических систем ацетилирования, окисления и регуляция их ферментативной активности ксимедоном. Дис. ... канд. хим. наук. Казань; 2008.
15. *Погорельцев В.И., Ефремов Ю.Я., Шарафутдинова Д.Р. и др.* Пути метаболизма и особенности элиминации ксимедона в организме человека. *Нижегородский мед журнал* 2005; 2: 228—231.
16. *Полякова А.А., Хмельницкий Р.А.* Масс-спектрометрия в органической химии. Л: Химия; 1982; 386 с.