УДК 612.1

Оценка показателей периферической крови и цитогенетических показателей при использовании соединений медь-органических комплексов после ожога

А.Г. Карапетян[1], А.М. Даллакян[1], Ж.Г. Петросян[1], Н.К. Арутюнян[1], М. Порчия[2], К. Сантини[3]

[1]Национальный ожоговый центр
0054, Ереван, Давидашен, п/я 25,
[2] Институт химии конденсированных сред
и технологий для энергетики ICMATE (Падуя),
[3] Университет города Камерино (Италия)

Ключевые слова: ожог, медь-органические комплексы, пролиферативная активность, хромосомные аберрации, плоидность клеток, количество эритроцитов, лейкоцитов, уровень гемоглобина

Обширные глубокие ожоги вызывают возникновение комплекса своеобразных патологических функциональных и морфологических изменений внутренних органов и систем организма. Согласно многочисленным литературным данным, существенным фактором в дальнейшем развитии повреждений тканей после ожоговой травмы является чрезмерная активация перекисного окисления липидов клеточных мембран и появление избыточного количества свободных радикалов кислорода, генерируемых активированными лейкоцитами, а также образующихся в процессе тканевого протеолиза [8,9]. Ожоговая травма вызывает также глубокие изменения в гематологических показателях. При протекании крови через ткани в период ожога происходит тепловое повреждение и деструкция эритроцитов с выходом свободного гемоглобина в плазму [5–7]. Ожоговая болезнь также вызывает выраженную лейкоцитарную реакцию, которая описана многими исследователями в клинике и эксперименте [3,4].

Для заживления тканей при ожоге используются препараты, которые обладают противовоспалительными, болеутоляющими и регенерирующими свойствами [2]. В этой области особый интерес представляют металлорганические комплексы, основанные на меди и обладающие высокой антиоксидантной активностью.

Биологическая роль меди многообразна. Минерал входит в состав жизненно важных ферментов, выполняющих в организме сложные фун-

кции. Медь – основной компонент фермента цитохромоксидазы, осуществляющего клеточное дыхание во всех органах и тканях. Минерал является составным компонентом витаминов и гормонов, пигментных веществ. Медь оказывает влияние на синтез половых гормонов, нормализует работу эндокринной системы, активизирует инсулин.

Биогенная роль меди заключается в участии в процессах кроветворения. Микроэлемент участвует в синтезе гемоглобина, осуществляющего перенос кислорода в организме, повышает скорость кровообращения. Медь участвует в синтезе коллагена и эластина, поддерживает тургор кожи. Без нее соединительная ткань теряет упругость, а кости и хрящи – эластичность. Важна медь и для нервной ткани, она входит в состав миелиновых оболочек нервных клеток, изолирующих нервные волокна. Медь активно участвует в метаболизме углеводов: активизирует окисление глюкозы, замедляет разрушение гликогена в печени. Для иммунной системы медь также имеет важное значение. Металл нейтрализует токсины микроорганизмов, пролонгирует действие антибактериальных препаратов, уменьшает воспалительные реакции.

Согласно литературным источникам и нашим ранним исследованиям [1,10–12], подобные комплексы, основанные на меди, обладают низкой токсичностью и выраженными радиозащитными свойствами.

С целью выявления возможного положительного действия на ожоги нами были исследованы соединения медь-органических комплексов: [Cu $(PTA)_4$] BF_4 и [Cu(PCN)($HBPz_3$)], где лигандами являются: PTA-1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane и PCN = tris(cyanoethyl)phosphine; $HBPz_3$ = trispyrazolylborato (далее в тексте – PTA и PCN), синтезированные в Университете города Камерино (Италия) под руководством профессора Карло Сантини и в National Research Council-CNR; Institute of Condensed Matter Chemistry and Technologies for Energy – ICMATE (Padova) by Marina Porchia.

Материал и методы

Нами для исследования возможного терапевтического действия при термических ожогах были использованы PTA и PCN. Эксперименты проводились на половозрелых, белых, беспородных крысах средней массой 180-200 г.

Животные были разделены на 4 группы:

I – только с термическим (чистым) ожогом,

II – термический ожог с инъекцией хелата Cu(PTA),

III – термический ожог с инъекцией хелата Cu(PCN),

IV – интактные животные (без ожога).

Животным на эпилированную поверхность кожи в области спины наносился термический ожог III A-B степени, 30% поверхности тела.

Через 30 мин после нанесенного ожога животным II и III групп внутрибрюшинно вводились Cu-органические комплексы PTA и PNC дозой 50мг/кг в виде водной суспензии. Контрольную группу составляли животные с чистым ожогом. Инъекция проводилась через каждые двое суток в течение 14 дней до начала отторжения струпа раны.

Активность этих соединений оценивалась по выживаемости, средней продолжительности жизни, показывающей динамику гибели подопытных крыс в течение 30-дневного мониторинга.

Проводился визуальный мониторинг ожоговой раны. Наблюдения велись в течение 60 дней, когда раны полностью заживут и покроются шерстью.

Из хвостовой вены в определенные сроки (на 3,7,14 и 30-е сутки) забиралась кровь для гематологического анализа. Определялись следующие показатели: время свертываемости крови; число лейкоцитов (по классической методике с помощью камеры Горяева); уровень гемоглобина, эритроцитов, тромбоцитов.

Материалом для цитогенетического исследования является костный мозг из бедренной кости. По методике Ford-Wollam определялись: митотический индекс (МИ) в ‰, хромосомные аберрации (ХА) в % и полиплоидные клетки (ПК) в %.

Результаты и обсуждение

На 60-е сутки после полного заживления раны визуальный мониторинг показал, что регенерация эпителия, обрастание шерстью активнее отмечались в группе с внутрибрюшинной инъекцией хелата PTA, чем в группах контроля и инъекцией PCN.

Цитогенетические нарушения в процессе ожоговой травмы приведены на рис. 1.

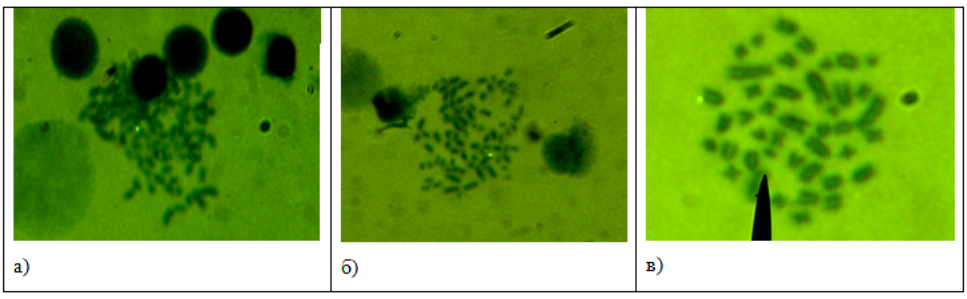

Рис. 1. Полиплоидные клетки (а,б), хромосомные аберрации в виде двойного фрагмента (в)

На 5-е сутки после ожога, когда крысы уже получили 3 инъекции металлокомплексов, анализ кариотипа показал, что все цитогенетические показатели в 3 группах подопытных животных статистически достоверно разнятся с данными кариотипа интактных особей. При сравнении цитогенетических показателей обеих групп крыс с введенными хелатами с данными контроля отмечалась небольшая вариабельность параметров без статистически значимых сдвигов, что отражено в табл. 1.

Таблица 1

Изменение цитогенетических показателей у 4 групп после ожога

Сроки после исслед.	5-е сутки после ожога				30-е сутки после ожога		
Группа	интактная	контроль	ожог+ PCN	ожог+ PTA	контроль	ожог+ PCN	ожог+ PTA
МИ, ‰	20,1±2,8	9,8±1,2*	10,1±1,5*	11,2±1,7*	12,8±1,8*	13,2±1,9*	17,0±1,2**
ХА, %	3,0±0,22	4,4±0,42*	4,6±0,44*	4,1±0,39*	4,2±0,48*	4,3±0,42*	3,8±0,4
ПК, %	0	4,0±0,38	3,9±0,4	3,2±0,36	3,3±0,36	2,9±0,31	2,0±0,24**

* Статистически достоверные отклонения показателей от нормы;
** статистически достоверные отклонения показателей от контроля

Как видно из табл. 1, при сравнении цитогенетических параметров последнего срока эксперимента 3 опытных групп с интактной группой отмечалась тенденция к уменьшению митотического индекса. В контрольной и PCN группах этот показатель все еще значительно ниже нормального, а в группе PTA он ближе к норме (разница между IV группой и группой ожог + PTA незначительна). Аберрантность хромосом, в основном в виде разрывов, в контрольной и PCN группах значительно выше нормы, а в группе PTA этот показатель не превышает статистически значимого уровня.

Сравнение кариотипов этого срока исследования групп PCN и PTA с контрольной группой показало, что цитогенетические параметры МИ и ПК группы PCN значительно отличаются от контроля. Это означает, что благодаря комбинации PTA показатели МИ и ПК имеют явную тенденцию к нормализации.

Суммируя цитогенетические показатели и критерии визуального мониторинга, а также отсутствие гибели животных в группе с инъекцией металлорганического комплекса PTA, можно заключить, что данный хелат активизирует репаративные процессы, улучшая цитогенетический статус подопытных крыс. Он, в частности, повышает пролиферацию костномозговых клеток, вследствие чего улучшается гемопоэз обожженных животных.

Гематологические показатели анализировались в динамике в течение всего срока эксперимента, результаты которого приведены в табл. 2.

Таблица 2

Показатели крови у крыс при чистом ожоге, инъкции PTA и PCN

Показатели	Дни	Контрольная группа	PTA	PCN
ВСК (сек)	3	415,0±7,63	340,0±35,46*	413,8±47,75
	7	327,5±32,5	217,5±42,25*	230,0±11,55*
	14	360,0±34,64	207,4±12,53*	150,0±20,31*
	30	316,7±52,47	195,0±36,63*	280,7±35,51
Лейкоциты (норма: 8,6±0,68 x10^9/л)	3	8,3±0,59	7,5±1,2	9,5±1,6
	7	10,2±2,2	17,6±1,1*	14,8±4,3
	14	8,8±0,7	11,7±0,7*	11,7±2,2
	30	5,93±0,6	11,54±2,1*	10,7±1,4*
Тромбоциты (N/μl)	3	588333,3±44378,42	489000±57649,8	568750,0±113933,0
	7	637500±2500	606250±48104,7	668333,3±64957,25
	14	495000±66583,28	405000±54815,71	392500±37052,89
	30	705000±5000	817000±43433,86*	576666,7±71316,98
Эритроциты (норма: 6,2±0,35 x10^{12}/л)	3	5,92±0,13	5,45±0,4	5,52±0,9
	7	3,13±0,1	3,88±0,35*	3,2±0,15
	14	6,56±0,18	5,23±0,19*	4,62±0,17*
	30	6,38±1,9	5,62±0,26*	6,0±0,8
Гемоглобин (норма: 158,0±14,6 г/л)	3	134,6±6,06	138,2±9,24	133,5±10,57
	7	136,5±5,5	97,3±1,2*	107,3±11,39*
	14	163,3±10,13	141,4±2,25*	136,2±2,52*
	30	161,3±1,76	139,2±3,39*	140,3±4,97*

* Статистически достоверные отклонения показателей от контроля

Как видно из табл. 2, ожог вызывает существенное изменение количества лейкоцитов в крови животных. Так, на 7-е сутки после травмы во всех группах отмечается увеличение числа лейкоцитов, что свидетельствует о протекании репаративных процессов. Наиболее высокие показатели получены на 7-е сутки исследования, так как в эти сроки к лейкоцитарной реакции организма присоединяется инфекция. И если у крыс из контрольной группы в конце исследований наблюдается лейкопения, то в группах с инъекциями наблюдается тенденция к нормализации. На 30-е сутки отмечается достоверное отличие уровня лейкоцитов у контрольной группы от групп с инъекцией комплексов PTA и PCN. К 30-м суткам в группах животных с ожогами + PTA и ожогами + PCN уровень лейкоцитов приближается к уровню лейкоцитов интактной группы (8,6 ± 0,68x10^9 / л).

Ожоговая травма, приводящая к угнетению гемопоэза, является причиной выраженной эритропении и анемии. Эти 2 показателя в ранние сроки (7-е сутки) исследования были значительно ниже величин, соответствующих нормам. Как видно из таблицы, на последних сроках наблюдения (14-е и 30-е сутки) отмечалось повышение числа эритроцитов

и коррелированный с ним уровень гемоглобина, отмечалось достоверное отличие этих показателей у контрольной группы и группы с введенным соединением PTA, что свидетельствует о благотворном влиянии этого комплекса.

Это заключение подтверждается также при расчете выживаемости и средней продолжительности жизни крыс. Эксперименты по выживаемости ставились на 21 крысе, по 7 особей на группу: чистый ожог; PTA+ожог и PCN+ожог. Эксперимент, поставленный для определения выживаемости и средней продолжительности жизни, показал, что в группе крыс с введенным комплексом PTA показатели значительно лучше (100% выживаемость), чем у животных только с ожогами (контроль), что отражено в табл. 3.

Таблица 3

Выживаемость и средняя продолжительность жизни крыс

Группа	Выживаемость, %	Средняя продолжительность жизни, дни
Контроль	57	20,57
PTA+ожог	100	30
PCN+ожог	57	19,57

Согласно уравнениям и кривым логарифмической регрессии, описывающим динамику выживаемости и приведенным на рис. 2, выживаемость группы с инъекцией комплекса PCN и контрольной группы идентична, и будет наблюдаться дальнейший спад этого процента в отличие от группы с введенным комплексом PTA.

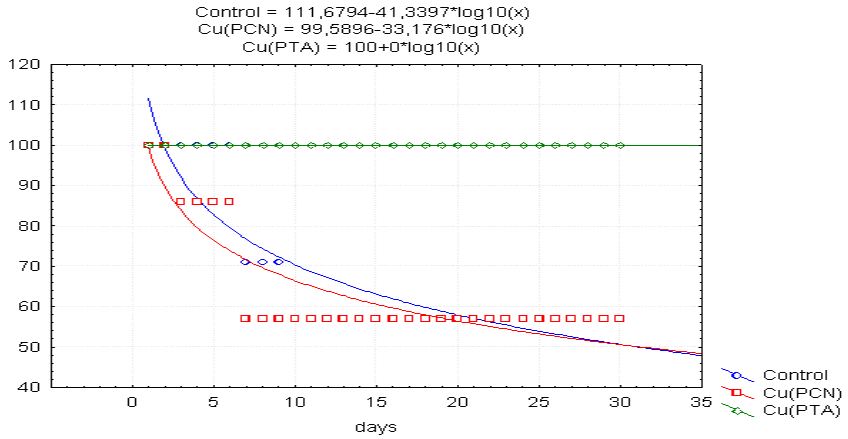

Рис. 2. Уравнения и кривые логарифмической регрессии, описывающие динамику выживаемости

Таким образом, основываясь на результатах выживаемости, средней продолжительности жизни, цитогенетики и гематологии, можно заклю-

чить, что исследуемый комплекс РТА проявляет ощутимые заживляющие свойства. Комплекс РТА проявил по всем наблюдаемым критериям благотворное воздействие на подопытных животных.

В ранние сроки анализов (3-и и 7-е сутки) оба соединения смягчают поражающее действие ожоговой травмы, но на последних сроках наблюдения (14-е и 30-е сутки) у группы с инъекией РТА многие показатели достоверно отличались от контрольных значений (чистый ожог) и приблизились к данным нормы.

Исследуемые Cu-лиганды эффективно способствуют репаративным процессам в костномозговых клетках, улучшая цитогенетический статус подопытных крыс. РТА, в частности, повышает пролиферацию костномозговых клеток, вследствие чего улучшается гемопоэз обожженных животных. Результаты данного, пока предварительного, исследования требуют продолжения поиска новых эффективных заживляющих средств для ожоговых поверхностей.

Поступила 14.01.20

Պերիֆերիկ արյան, բջջային և ժառանգական ցուցանիշների գնահատումը այրվածքային վնասվածքից հետո պղինձ-օրգանական կոմպլեքսների կիրառման դեպքում

Ա.Գ. Կարապետյան, Ա.Մ. Դալլաքյան, Ժ.Հ. Պետրոսյան, Ն.Կ. Հարությունյան, Մ. Պորչիա, Կ. Սանտինի

PTA և PCN միացությունների հատկությունները հետազոտվել են ջերմային այրվածքների դեպքում հնարավոր թերապևտիկ ազդեցության հայտնաբերման նպատակով:

Փորձերը կատարվել են սպիտակ սեռահասուն, 180-200 գրամ միջին քաշով առնետների վրա: Նախապես էպիլացված կենդանու մեջքի հատվածում առաջացրել ենք մակերեսի 30%-ի III A-B աստիճանի այրվածք, այնուհետև՝ այրվածք հասցնելուց 30 րոպե անց ներորովայնային ներարկման միջոցով առնետներին ներարկվել են տվյալ հելատները ջրային կախույթի տեսքով՝ 50մգ/կգ չափաբաժնով:

Առնետի պոչի երակից որոշակի ժամկետներում՝ 3,7,14 և 30-րդ օրերին, վերցվել է արյուն՝ արյունաբանական հետազոտությունների համար: Բջջագենետիկական հետազոտություններ իրականացնելու նպատակով վերցվում էր նաև ազդրոսկրի ոսկրածուծը: Հետազոտվել են 3 բջջագենետիկական ցուցանիշ՝ միտոտիկ ինդեքս, քրոմոսոմային աբերացիա և պոլիպլոիդ բջիջներ:

Հիմնվելով ապրելունակության, կյանքի միջին տևողության, բջջագենետիկական և արյունաբանական արդյունքների վրա՝ կարող ենք եզրակացնել, որ PTA համալիրը ցուցաբերում է շոշափելի բուժիչ հատկություններ: Ըստ դիտարկված բոլոր չափանիշների՝ PTA համալիրը բարենպաստ ազդեցություն է թողել փորձարարական կենդանիների վրա:

Վերլուծության վաղ փուլերում (3-րդ և 7-րդ օրերին) PTA և PCN միացությունները մեղմացնում են այրվածքային վնասվածքի վնասակար հետևանքները, իսկ 14-րդ և 30-րդ օրերին՝ PTA ներարկման խմբում, բազմաթիվ ցուցանիշներ զգալիորեն տարբերվում էին ստուգիչ խմբից (մաքուր այրվածքի խումբ) և ավելի մոտ էին նորմայի տվյալներին:

Ուսումնասիրված Cu լիգաներն արդյունավետորեն նպաստում են ոսկրածուծի բջիջներում րեպարատիվ գործընթացներին՝ բարելավելով փորձարարական կենդանիների բջջագենետիկ կարգավիճակը: Մասնավորապես այն մեծացնում է ոսկրածուծի բջիջների պրոլիֆերացիան, ինչի արդյունքում բարելավվում է այրվածք ստացած կենդանիների հեմոպոեզը: Մինչ այժմ անցկացված այս նախնական ուսումնասիրության արդյունքները վկայում են, որ անհրաժեշտ է շարունակել այրվածքային մակերեսների նոր արդյունավետ բուժիչ միջոցների որոնումը:

Evaluation of Peripheral Blood Indicators and Cytogenetic Indicators Using Copper-organic Complex Compounds after Burning

A.G. Karapetyan, A.M. Dallakyan, J.H. Petrosyan, N.K. Harutyunyan, M. Porchia, C. Santini

The PTA and PCN compounds were investigated by us for their possible therapeutic effect in thermal burns. The experiments were conducted on white outbred, mature rats of both gender with an average weight of 180-200 g.

The test complexes with a dose of 50 mg/kg of body weight were administered intraperitoneally 30 minutes after applying the burn in the form of an aqueous suspension of Cu (PTA) and Cu (PCN). Injection of chelates was carried out every 2 days once for 2 weeks until the burn scab was rejected.

The burn wound was visually monitored, blood was taken at a certain time from the tail vein for hematological analyzes and the bone marrow from the femur for cytogenetic studies (mitotic index (MI) in ‰, chromosomal aberration (CA) in % and polyploid cells (PC) in %-Oh).

Based on the results of survival, life expectancy, cytogenetics and hematology, we can conclude that the PTA complex under study exhibits tangible healing properties. According to all observed criteria, the PTA complex showed beneficial effects on experimental animals.

In the early stages of the analysis (days 3 and 7), the PTA and PCN compounds mitigate the damaging effects of burn injury, but in the final follow-up periods (days 14 and 30) in the group with PTA injection many indicators significantly differed from control values (clean burn) and were closer to the norm data.

The studied Cu ligands effectively promote reparative processes in bone marrow cells, improving the cytogenetic status of experimental rats. In particular, it increases the proliferation of bone marrow cells, as a result of which the hematopoiesis of burnt animals improves. The results of this preliminary study so far require a continuation of the search for new effective healing agents for burn surfaces.

Литература

1. *Баджинян С.А., Малакян М.Г., Егиазарян Д.Э., Даллакян А.М., Вардеванян Л.А.* Сравнительное изучение радиозащитной активности комплексов меди с шиффовыми основаниями, производными L-тирозина и L- фенилаланина. Актуальные проблемы радиационной безопасности, Ереван, 2014, с.61-64.
2. *Булоян С.А.* Действие мази Дермафен на регенераторные процессы кожи белых крыс после экспериментального термического ожога. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований, 2015, 10-2, с. 268-272.
3. *Гублер Е.В., Хребтович В.Н., Суббота А.Г.* Термические ожоги и ожоговая болезнь. В кн.: Моделирования заболеваний. Под ред. С.В. Андреева. М., 1972, с.46-59.
4. *Зиновьев Е.В. и др.* Новые Санкт-Петербургские врачебные ведомости, 2006, 3, с.73-74.
5. *Логинов Л.П., Смирнов С.В., Хватов В.Б. и др.* Гемотрансфузии у обожженных в процессе восстановления кожного покрова. Сб. науч. трудов II съезда комбустиологов России, г. Москва, 2008, М., с.108–109.
6. *Муразян Р.И., Илюхин А.В.* О деструкции эритроцитов при обширных ожогах. Клин. мед., 1971, 6, с. 44–49.
7. *Слесаренко С.В.* Анемия при ожоговой болезни и возможности ее коррекции. Вестник хирургии им. И.И. Грекова,1997, т.156, 4, с. 37–41.
8. *Смирнов С.В., Спиридонова Т.Г., Пахомова Г.В. и др.* Перекисное окисление липидов у больных с ожоговой травмой, осложненной гастродуоденальным кровотечением. Комбустиология, 2008, 1, с.10–13.
9. *Ушакова Т.А.* К вопросу о перекисном окислении липидов у больных с ожоговой травмой. Комбустиология, 2008, 2, с. 4–8.
10. *Bhirud R. G., Srivastava T. S.* Superoxide dismutase activity of $Cu(II)_2(aspirinate)_4$ and its adducts with nitrogen and oxygen donors. Inorganica Chimica Acta, 1990, v.173, 1, p.121-125.
11. *Pogosyan A.S., Dallakyan A.M., Karapetyan A.G., Hovhannesyan A.N.* Role and probable mechanisms of polyploidy cells formation in irradiated organism. International Conference Radiation Safety challenges in the 21-th Century. Proceedings, Yerevan, 2012, p.85-86.
12. *Riley D.P.* Functional mimics of superoxide dismutase enzymes as therapeutic agents, Chem. Rev., 1999, 99, p.2573–2588.