

На правах рукописи

МОСКОВЦЕВ СЕРГЕЙ ИВАНОВИЧ



**АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ ЦИНКА,
МЕДИ, КОБАЛЬТА И МАРГАНЦА С ПРОИЗВОДНЫМ
НИТРОИМИДАЗОЛА И ИХ ВЛИЯНИЕ
НА ТЕЧЕНИЕ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА**

03.00.07 - микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Саратов - 2004

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Курский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации».

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор **Лазурина Людмила Петровна.**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор **Девдариани Зураб Леванович,**
доктор биологических наук, старший научный сотрудник **Игнатов Олег Владимирович.**

Ведущая организация:

Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.М. Габричевского.

Защита диссертации состоится « 8 » августа 2004 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 208.078.01 по присуждению ученой степени доктора (кандидата) наук при Российском научно-исследовательском противочумном институте «Микроб» Минздрава России (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб».

Автореферат разослан « 1 » сентября 2004 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук



Слудский А.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

В настоящее время инфекционные заболевания имеют большой удельный вес в общей структуре патологии человека. Выделено и идентифицировано более 600 видов микроорганизмов — возбудителей инфекционных процессов различной локализации. Однако во многих случаях лечение и профилактика инфекционных заболеваний продолжают оставаться сложной и трудноразрешимой проблемой в связи с распространением резистентности различных видов микроорганизмов к имеющимся антибактериальным средствам.

Поэтому поиск биологически активных веществ, которые надежно и в короткий срок могут подавлять рост инфекционного агента, купировать болевой синдром и адсорбировать экссудат, т.е. обладать выраженным многонаправленным действием, остается в настоящее время актуальной задачей.

Значительно повысился интерес к использованию лекарственных средств, которые учитывали бы индивидуальные особенности организма больного (и, в первую очередь, состояние иммунной системы), специфику инфекционного процесса и стадии его развития. Одним из факторов,отягощающих течение инфекционной патологии, является нарушение баланса биометаллов.

Комплексообразование уже известных лекарственных средств с биометаллами является одним из эффективных направлений поиска новых биологически активных соединений, так как оно позволяет сочетать в одном веществе различные виды активности, которые к тому же могут взаимно усиливать друг друга, расширять спектр действия, снижать токсичность лекарственных средств.

Настоящая работа посвящена изучению биологической активности новых синтезированных комплексных соединений *in vitro* и на модели инфицированной раны, а также возможности коррекции баланса биометаллов при этой патологии.

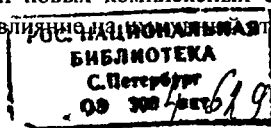
В качестве металлов-комплексообразователей были выбраны марганец, цинк, медь и кобальт, а в качестве лиганда - производное 5-нитроимидазола (метронидазол).

Работа выполнена в соответствии с планом научных исследований Курского государственного медицинского университета (номер государственной регистрации 01.20.02 14925).

Целью работы явилось изучение антимикробной активности новых комплексных соединений цинка, меди, кобальта и марганца с метронидазолом и оценка возможности их использования для лечения экспериментальной инфицированной раны и коррекции металло-лигандного гомеостаза.

Поставленная цель достигалась решением следующих задач.

1. Изучение биологической активности новых комплексных соединений (антимикробная активность, токсичность, влияние на иммунный статус ор-



ганизма) с целью дальнейшего использования наиболее эффективных из них в составе антимикробных лекарственных препаратов.

2. Исследование влияния новых биоконплексов на течение экспериментальной стафилококковой инфекции.

3. Разработка состава гидрофильной мази, содержащей новые биоконплексы, предназначенной для лечения гнойно-воспалительных заболеваний.

4. Изучение антимикробной и ранозаживляющей активности многокомпонентных мазей в эксперименте при моделировании инфицированной раны.

5. Исследование возможности коррекции металло-лигандного гомеостаза новым комплексным соединением цинка с метронидазолом в эксперименте на модели инфицированной раны.

Научная новизна работы определяется следующим:

- впервые изучена биологическая активность новых синтезированных комплексных соединений металлов с метронидазолом.. Установлено, что новые биоконплексы марганца (II), меди (II), цинка (II) и кобальта (II) с метронидазолом обладают выраженным антимикробным и иммуномодулирующим действием и относятся к классу малотоксичных веществ;

- на модели экспериментальной стафилококковой инфекции показана высокая терапевтическая эффективность комплексов меди, цинка и кобальта с метронидазолом;

- в эксперименте на животных при лечении инфицированной раны выявлена высокая ранозаживляющая активность разработанной мази на гидрофильной основе, содержащей в своем составе новые комплексы металлов с метронидазолом, тримекаин, спериулин, платенсис и аскорбиновую кислоту.

Показана возможность коррекции металло-лигандного гомеостаза биоконплексом цинка с метронидазолом при моделировании гнойно-воспалительного процесса.

Практическая значимость работы. Установленная высокая антимикробная активность новых биоконплексов позволяет рекомендовать эти соединения для дальнейшего изучения в качестве препаратов выбора при лечении инфекций, вызванных различными видами облигатно и факультативно анаэробных микроорганизмов.

Предложен состав многокомпонентной мази на гидрофильной основе для лечения инфицированных ран, обеспечивающий выраженный антимикробный и ранозаживляющий эффект и сокращающий сроки лечения.

В эксперименте на модели инфицированной раны установлена возможность коррекции металло-лигандного гомеостаза при использовании нового биоконплекса цинка с метронидазолом.

Проведенные исследования позволяют предложить пути модификации известных лекарственных средств и биологически активных соединений с це-

лью получения высокоэффективных нетоксичных антимикробных препаратов.

По материалам диссертации опубликованы «Методические рекомендации по изготовлению, контролю качества и использованию мазей на полимерных основах, содержащих метронидазол и биокомплекс цинка с метронидазолом» (утверждены ректором Курского государственного медицинского университета 5 января 2004 г.).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Новые биокомплексы марганца (II), цинка (II), меди (II) и кобальта (II) с метронидазолом обладают выраженной антимикробной активностью и низкой токсичностью. Комплексообразование с металлами повышает антибактериальное и иммуномодулирующее действие исходного лиганда — метронидазола.

2. Биокомплексы марганца (II), цинка (II), меди (II) и кобальта (II) с метронидазолом характеризуются высокой терапевтической эффективностью на модели экспериментальной стафилококковой инфекции.

3. Состав и технология гидрофильной мази, содержащей биокомплекс цинка (II), кобальта (II), марганца (II) или меди (II) с метронидазолом, местный анестетик тримекаин, спинулину платенсис, аскорбиновую кислоту и обладающей антимикробным и ранозаживляющим действием.

4. Применение нового биокомплекса цинка с метронидазолом способствует коррекции нарушения металло-лигандного гомеостаза, возникающего при развитии экспериментального инфекционного процесса в организме.

Апробация результатов работы. Основные положения работы представлены на научных конференциях Курского государственного медицинского университета (2001, 2002 гг.), научно-практической конференции «Медицина будущего» (Краснодар, 2002 г.), конференции «Актуальные проблемы медицины и биологии» (Томск, 2003 г.), Всероссийской научно-практической конференции «Новые медицинские технологии в охране здоровья здоровых, в диагностике, лечении и реабилитации больных» (Пенза, 2003 г.), межкафедральной научной конференции Курского государственного медицинского университета (Курск, 2003 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, 4-х глав экспериментальных исследований, заключения, выводов, списка литературы и приложений. Содержит 137 страниц машинописного текста, 28 таблиц и 12 рисунков. Библиографический указатель включает 218 источников литературы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Для решения поставленных задач применен комплекс современных микробиологических, иммунологических, физико-химических, гистологических и математических методов, обеспечивающих реализацию поставленных цели и задач. В качестве объектов исследования использованы образцы цельной крови и некоторые органы экспериментальных животных. Объем исследования биологической активности синтезированных биокомплексов составил 659 проб биологических объектов (кровь и органы животных), на содержание в них металлов - 244 пробы, 135 объектов для гистологического и 144 пробы для микробиологического исследования мазей, т.е. всего 1182 биопробы.

Сложность лечения инфекционных заболеваний различной этиологии традиционными лекарственными средствами и сопутствующее им нарушение баланса микроэлементов обусловили необходимость синтеза комплексных соединений металлов с антимикробными препаратами. В качестве биологически активного лиганда был выбран метронидазол (1-(*p*-оксиэтил)-2-метил-5-нитроимидазол), который в последние годы часто применяется для лечения и профилактики различных инфекционных осложнений. В качестве металлов-комплексобразователей для синтеза были выбраны медь (II), цинк (II), марганец (II) и кобальт (II), доказана индивидуальность выделенных комплексов, установлен их состав.

Определение антимикробной активности в отношении облигатно анаэробных микроорганизмов проводили методом двухслойной агаровой культуры. Для исследования антимикробного действия в отношении анаэробных микроорганизмов были использованы как спорообразующие, так и неспорообразующие тест-культуры микроорганизмов из коллекции ГИСК им. Л.А. Тарасевича (г. Москва). Спорообразующие микроорганизмы - *Clostridium perfringens* 271, неспорообразующие - *Bacteroides fragilis* 323, *Bacteroides melaninogenicus* 1011, *Fusobacterium necrophorum* VPJ 2523, *Peptococcus magnus* 336, *Peptostreptococcus* HC.

Антибактериальную активность метронидазола, его комплексных соединений с биометаллами и мазей, приготовленных на их основе, в отношении факультативно анаэробных микроорганизмов определяли *in vitro* методом диффузии в агар (Государственная фармакопея. XI издание, 1990 - ГФ XI). В соответствии с рекомендациями ВОЗ для оценки активности новых биокомплексов в качестве тест-культур использовали штаммы аэробных бактерий и грибов из коллекции ГИСК им. Л.А. Тарасевича, (Москва): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* 209 P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 10702, *Eschenchia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* NCTC 2625.

Активность биоконплексов *in vivo* изучали на белых мышах (весом 18-20 г) при моделировании - стафилококковой инфекции. Для этого мышей внутрибрюшинно заражали - взвесью суточной агаровой культуры *Staphylococcus aureus* № 554 в дозе 1×10^7 микробных тел/мл, вызывающей гибель 50% мышей в течение 7 суток, и через сутки после заражения в течение 7 дней ежедневно внутримышечно вводили исследуемые препараты.

Терапевтическую эффективность биоконплексов оценивали по выживаемости животных.

Определение токсичности биоконплексов проводили на мышах при внутрибрюшинном способе введения (Арзамасцев Е.И, 1988; Беленький МЛ.', 1963).

Изучение влияния биоконплексов на показатели иммунологической реактивности организма проведено на крысах-самцах линии Вистар массой 100-120 г. Препараты вводились внутримышечно в дозе 30 мг/кг животного один раз в сутки в течение 11 дней. По истечении определенного времени животных усыпляли эфиром, вскрывали грудную полость и производили забор крови из нисходящей части грудной аорты. Из факторов неспецифической защиты определяли фагоцитарную активность лейкоцитов, активность бактерицидных систем фагоцитов (кислородзависимых и кислороднезависимых), резервную функцию системы фагоцитоза, уровень сывороточного лизоцима и бактерицидную активность сыворотки крови.

Фагоцитарная реакция оценивалась в отношении *S.aureus* 209 P с определением процента активных фагоцитов (фагоцитарный индекс) и числа поглощенных частиц в пересчете на одну фагоцитирующую клетку (фагоцитарное число). Завершенность фагоцитоза определялась как процент микробных клеток, подвергшихся разрушению фагоцитами при двухчасовом инкубировании.

Оценка состояния кислородзависимых бактерицидных систем фагоцитов проводилась *in vitro* с помощью НСТ-теста, отражающего способность супероксиданиона восстанавливать нитросиний тетразолий в диформаза. НСТ-тест оценивали по степени восстановления нитросинего тетразолия в спонтанной и продигозан-стимулированной реакциях при учете внутриклеточных отложений диформаза. В работе использовали НСТ фирмы «Lachema» (Чехия). Резервная функция системы фагоцитоза оценивалась как разница между показателями стимулированного и спонтанного теста (Виксман М.Е, Маянский А.Н., 1979).

Для определения активности кислороднезависимой бактерицидной системы использовали лизосомально-катионный тест, основанный на определении лизосомальных катионных белков в гранулах лейкоцитов периферической крови в мазках, окрашенных бромфеноловым синим (Шубич М.Г., 1974; Пигаревский В.Е., 1979).

Уровень лизоцима определяли по методу О.В. Бухарина (1997), бактерицидную активность сыворотки - по О.В. Смирновой, Т.А. Кузьминой (1966).

Для изучения действия новых биокомплексов на клеточный и гуморальный иммунный ответ крысам-самцам линии Вистар исследуемые препараты вводили внутримышечно в твине и физрастворе в течение 5 дней в дозе 30 мг/кг с последующей иммунизацией животных эритроцитами барана и определением уровня развития гуморального иммунного ответа путем определения в селезенке количества антитело- и розеткообразующих клеток.

Для изучения терапевтической эффективности мазей, содержащих новые биокомплексы, на крысах-самцах линии Вистар моделировали инфицированную гнойную рану. Под гексеналовым наркозом в асептических условиях наносилась полнослойная кожная рана на предварительно выбритой спине крысы по паравертебральной линии $2 \times 2 \text{ см}^2$, которую инфицировали 0,2 мл взвеси суточной агаровой культуры *S.aureus* № 552, содержащей 1×10^9 микробных тел/мл. На 3 сутки от момента инфицирования развивалось острое гнойное воспаление - формировался выраженный воспалительный процесс с отеком и гиперемией кожи. Начиная с 3 суток проводилось лечение раны мазями, содержащими биокомплексы металлов с метронидазолом. Морфологические исследования тканей раны, изучение обсемененности и показателей иммунореактивности производили после декапитации животных на 3, 5, 7, 9 и 15 сутки. Оценка динамики репаративных процессов в ране производилась с учетом наличия и характера воспалительной реакции, состояния краев и дна раны, сроков очищения ран от некротических тканей и появления грануляций, сроков эпителизации раны. Скорость заживления ран определяли в динамике заживления путем измерения площади раны, зарисованной перманентным маркером на прозрачной диапозитивной пленке. Гистоструктурные изменения в раневых биоптатах изучали при исследовании препаратов, окрашенных гематоксилин-эозином. Изучение иммуореактивности производилось по изложенным выше методикам.

Количественное содержание биометаллов в крови и органах экспериментальных животных в ответ на реактивные изменения в организме проведено с помощью метода атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой (АЭС-ИСП). Координационное соединение метронидазола с цинком вводили внутримышечно в дозе 27 мг/кг один раз в сутки ежедневно в течение 7 дней после моделирования патологического процесса.

Все полученные данные подвергнуты статистической обработке с определением критерия Стьюдента при помощи программы «Biostat» на IBM PC компьютере.

Результаты исследования и их обсуждение

Для лечебно-профилактических целей был синтезирован ряд биокомплексов марганца меди, цинка и кобальта с метронндазолом и изучена их биологическая активность, так как ее определение является важной задачей не только в

связи с возможностью их практического использования, но и может служить теоретической основой для целенаправленного синтеза соединений с заданными свойствами.

Учитывая имеющиеся в литературе данные о том, что инфекционные процессы чаще всего вызываются смешанной микрофлорой, особый интерес представляло изучение действия комплексов цинка, меди, кобальта и марганца с метронидазолом на факультативные анаэробы, так как, по литературным данным, сам метронидазол мало активен в отношении этих микроорганизмов. Антимикробная активность синтезированных комплексов была исследована в отношении тест-штаммов микроорганизмов, рекомендованных ГФ-Х1.

Изучение антимикробного действия новых биоконплексов по отношению к облигатно анаэробным микроорганизмам при помощи метода двухслойной агаровой культуры показало отсутствие достоверных различий между исходным лигандом и его комплексами с металлами. Таким образом, введение в состав метронидазола эссенциальных металлов не оказывало отрицательного действия на его активность в отношении основных мишеней действия препарата.

В результате проведенных сравнительных исследований на факультативно анаэробных микроорганизмах было выяснено, что биоконплексы обладают антимикробной активностью, но в разной степени (табл. 1). Наиболее выраженное антимикробное действие было обнаружено у биоконплексов меди, кобальта и цинка в отношении всех исследованных тест-микробов. При этом биоконплекс меди с метронидазолом показал наилучшие результаты. в отношении *P.vulgaris*, *B.subtilis*, *S.aureus* 209 P и *C.albicans*, причем зоны задержки роста практически во всех случаях были достоверно больше, чем у комплексных соединений цинка и кобальта с метронидазолом.

Таблица 1

Антимикробная активность комплексов метронидазола с металлами

Тест-культура	Диаметр зоны задержки роста бактерий исследованными препаратами в мм (M±m)				
	MN	MNCu	MNCo	MNZn	MNMn
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	9,2±0,2	24,3±0,5	20,3±0,4	24,6±0,5	18,3±0,4
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	8,2±0,2	25,3±0,5	23,1±0,5	23,3±0,4	15,3±0,3
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	9,8±0,2	33,3±0,6	29,3±0,6	27,0±0,5	17,6±0,4
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10702	6,8±0,3	27,3±0,5	27,0±0,5	24,3±0,5	17,0±0,4
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	8,2±0,3	20,3±0,4	23,0±0,4	25,0±0,5	18,3±0,5
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	7,9±0,3	25,0±0,6	20,2±0,4	20,6±0,4	16,6±0,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	7,0±0,2	24,7±0,5	32,3±0,6	19,0±0,5	16,6±0,3
<i>Candida albicans</i> NCTC 2625	8,0±0,2	19,0±0,4	14,0±0,3	16,0±0,3	11,6±0,2

Примечание: MN – метронидазол; MNCu – комплекс меди с метронидазолом; MNCo – комплекс кобальта с метронидазолом; MNZn – комплекс цинка с метронидазолом; MNMn – комплекс марганца с метронидазолом. Антимикробная активность комплексов достоверно отличается от показателей метронидазола

В случае использования комплекса кобальта с метронидазолом наибольшая активность наблюдалась в отношении *P.aeruginosa*, *B.subtilis*. Антимикробная активность комплексного соединения цинка с метронидазолом наиболее ярко проявилась в отношении *S.aureus*, *E.coli* и *B.subtilis*.

Комплексное соединение марганца с метронидазолом обладало меньшим антимикробным действием по сравнению с другими биокомплексами, но гораздо большим, чем сам метронидазол.

Таким образом, испытания антимикробной активности препаратов показали, что комплексообразование марганца, цинка, меди и кобальта с метронидазолом позволяет значительно увеличить антимикробную активность и расширить спектр действия комплексов по сравнению с исходным лекарственным средством.

Также была проведена сравнительная оценка антимикробной активности метронидазола, бензилпенициллина, оксациллина и цефазолина.

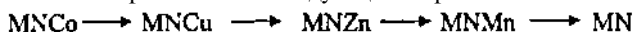
Установлено, что антимикробная активность наиболее эффективного из этих препаратов цефазолина в 4-5 раз превосходит активность метронидазола в отношении *S.aureus* 209 P и *B.subtilis* и в 3-4 раза - в отношении *B.cereus*, *E.coli*, *P.vulgaris* и *P.aeruginosa*.

Для более полной характеристики антимикробного действия препарата в отношении указанных тест-штаммов аэробных бактерий изучен механизм действия препаратов (бактерицидный или бактериостатический) и установлены их минимальные подавляющие концентрации. Для достижения указанных целей исследовано антибактериальное действие метронидазола и его комплексов с металлами методом серийных разведений в жидкой питательной среде.

Показано, что метронидазол оказывает подавляющее действие на *S.aureus*, *E.coli*, *B.subtilis*, *B.cereus*, *C.albicans* в концентрации 2,5 мг/мл, а на *P.vulgaris*, *P.aeruginosa* - в концентрации 5,0 мг/мл.

Дальнейшие исследования антимикробной активности комплексных соединений метронидазола с металлами показали, что комплекс метронидазол - кобальт оказывает бактерицидное действие на все тест-культуры в дозе 0,63 мг/мл. Наименьшие бактерицидные концентрации в отношении исследованных штаммов микроорганизмов были установлены для комплекса меди с метронидазолом в отношении тест-культур: *S.aureus* ATCC 25923 и 209 P, *B.subtilis* и *E.coli* - 0,63 мг/мл, в отношении *B.cereus*, *P.vulgaris*, *P.aeruginosa* и *C.albicans* - 1,25 мг/мл. Минимальные бактерицидные концентрации комплекса метронидазол - цинк изменялись в диапазоне от 0,63 до 1,25 мг/мл, а для комплекса метронидазол - марганец - от 1,25 до 2,5 мг/мл в отношении исследованных штаммов.

Исследованные комплексы в порядке убывания их антибактериального действия можно расположить следующим образом:



Таким образом, комплексообразование меди, цинка, марганца и кобальта с метронидазолом повышает его активность, что позволяет рекомендовать данные комплексные соединения в качестве антимикробных лекарственных средств для лечения гнойно-воспалительных заболеваний.

Однако данный вывод требовал подтверждения в опытах на лабораторных животных, поскольку далеко не всегда антимикробное действие препарата, установленное *in vitro*, может совпадать с его активностью в живом организме. Поскольку все исследованные биоконплексы, за исключением комплекса метронидазол - марганец, показали выраженную активность в отношении стафилококков, то были проведены исследования протективной активности комплексов меди, марганца, кобальта и цинка в опытах на мышах при внутрибрюшинном их заражении культурой *S.aureus*. Еще одной предпосылкой к использованию модели с применением стафилококков было то, что *S.aureus*, по данным литературы, является наиболее часто встречающимся ассоциантом при хирургической инфекции.

Следует отметить значительное увеличение *in vivo* биологической активности биоконплексов по сравнению с исходным лигандом. Выживаемость животных при лечении комплексными соединениями меди, кобальта и марганца с метронидазолом составила 90, 80 и 65% соответственно, тогда как гибель мышей в контрольной группе на 7 день составила 50%. В случае использования для лечения комплексного соединения цинка с метронидазолом практически все животные были живы.

Таким образом, исследование антибактериальной активности комплексов метронидазола с металлами позволяет сделать заключение, что в большинстве случаев включение металлов (кобальт, медь, цинк, марганец) в структуру лекарственного средства приводит к повышению специфической активности исходного лиганда и расширению спектра его действия.

Поскольку известно, что микроэлементы принимают активное участие в процессах иммуногенеза, то нами были предприняты опыты по оценке влияния биоконплексов метронидазола с металлами на показатели иммунного ответа. Было установлено, что введение метронидазола существенно не влияло на формирование гуморального иммунного ответа, индуцированного эритроцитами барана (табл. 2). Об этом свидетельствует тот факт, что количества АОК в селезенке крыс, получавших физ. раствор и метронидазол, существенно не отличались друг от друга.

Однако повышение числа РОК почти в 2 раза по сравнению с контролем, отмеченное в случае введения метронидазола в твине, указывает на влияние данного препарата на Т-клеточное звено иммунитета. У биоконплекса марганца с метронидазолом не наблюдалось достоверных отличий в показателях иммунореактивности по сравнению с лигандом. Введение же биоконплексов цинка, кобальта и, особенно, меди с метронидазолом активизировало иммуномодули-

рующее действие лиганда на формирование гуморального иммунного ответа на эритроциты барана. Об этом свидетельствовал факт повышения по сравнению с лигандом количества АОК в 1,5-2 раза. Количество РОК в селезенке крыс, получавших биокомплексы метронидазола, существенно не отличались от лиганда, за исключением соединения с цинком.

Таблица 2

Иммуномодулирующие свойства новых биокомплексов метронидазола

№ гр.	Условия опыта	Сроки иммунизации, сутки	Число животных	Селезенка	
				АОК тыс/орган (M±m)	РОК млн/орган (M±m)
1.	Введение физраствора в твине и иммунизация ЭБ	5	8	2,91±0,34	13,38±1,76
2.	Введение метронидазола в твине и иммунизация ЭБ	5	8	2,89±0,34	24,26±2,79 ¹
3.	Введение биокомплекса цинка с метронидазолом в твине и иммунизация ЭБ	5	8	4,09±0,48 ^{1,2}	42,29±4,80 ^{1,2}
4.	Введение биокомплекса кобальта с метронидазолом в твине и иммунизация ЭБ	5	8	5,66±0,66 ^{1,2}	18,92±1,70 ¹
5.	Введение биокомплекса меди с метронидазолом в твине и иммунизация ЭБ	5	8	6,90±1,94 ^{1,2}	24,14±2,80 ¹
6.	Введение биокомплекса марганца с метронидазолом в твине и иммунизация ЭБ	5	8	3,84±1,01	19,59±2,25 ¹

Примечание: ЭБ - эритроциты барана; 1 - достоверность различия данных относительно 1-й группы ($p < 0,05$); 2 - достоверность различия данных относительно 2-й группы ($p < 0,05$)

Таким образом, комплексные соединения цинка, меди и кобальта с метронидазолом оказывают стимулирующее действие на гуморальное звено иммунного ответа.

Важным фактором антиинфекционной защиты, определяющим дальнейшее развитие инфекционного процесса, является ее неспецифическое звено. Результаты исследования влияния биокомплексов на фагоцитарную активность лейкоцитов показали, что более высокие показатели фагоцитоза отмечены в группах животных, которым вводили биокомплексы цинка, кобальта и меди с метронидазолом. Так, у этих животных фагоцитарный индекс значительно превышал показатели как контрольной группы, которой вводили физ. раствор, так и группы, которой вводили метронидазол.

Изучение активности кислородзависимых бактерицидных систем нейтрофилов в тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) также свидетельствует о стимулирующем влиянии исследованных биокомплексов.

При этом наиболее высокие показатели отмечаются в группе животных, получавших комплекс цинка с метронидазолом. Отсутствие разницы в показателях спонтанного НСТ-теста и наличие положительной динамики в стимулированном его варианте привело к увеличению функционального резерва нейтрофилов. Использование же комплекса кобальта с метронидазолом оказывало выраженный стимулирующий эффект на кислороднезависимые бактерицидные системы нейтрофилов, определяемые в тесте на лизосомальные катионные белки. Стимуляция бактерицидных систем нейтрофилов послужила источником усиления завершенности фагоцитоза под действием комплексов метронидазола с металлами.

Что касается воздействия исследованных препаратов на гуморальные факторы неспецифической защиты организма животных, то можно отметить их положительное влияние. Изменения такого интегрального показателя гуморальных факторов неспецифической защиты организма, как бактерицидная активность сыворотки крови, характеризовались статистически более высокими значениями в группах опытных животных по сравнению с группой контроля.

Таким образом, установлено, что изучаемые биокомплексы повышают фагоцитарную активность нейтрофилов и стимулируют бактерицидную активность сыворотки крови крыс. Кроме того, на основании полученных данных можно констатировать факт более выраженного по сравнению с метронидазолом иммуномодулирующего действия биокомплексов метронидазола на гуморальное звено иммунитета.

Определение токсичности координационных соединений метронидазола с металлами были выполнены на нелинейных мышах (самцы и самки весом 18-20 г) при внутрибрюшинном способе введения. Исследуемые вещества вводили в виде свежеприготовленных подогретых водных растворов в концентрации от 120 до 1400 мг/кг веса. Длительность наблюдения за подопытными животными после введения препаратов составляла 14 дней.

Установлено, что наименее токсичным по показателю LD_{50} является метронидазол, а наибольшей токсичностью обладает его комплекс с кобальтом. Однако следует отметить, что как сам метронидазол, так и синтезированные на его основе биокомплексы цинка, кобальта, меди и марганца характеризуются сравнительно низкой токсичностью и в соответствии с классификацией токсичности, принятой ВОЗ, относятся к классу малотоксичных веществ.

Учитывая их низкую токсичность, отсутствие раздражающего эффекта и антибактериальную активность целесообразно было испытать указанные комплексы при экспериментальной гнойной ране.

Так как в терапии раневой инфекции наиболее часто используются различные мази, то нами при разработке мази учитывалась природа носителя. Выбор мазевой основы осуществляли с учетом ее способности к высвобождению действующих веществ. Мазь готовили на общеизвестных и широко используе-

мых в производстве мазей основах липофильной (вазелин; вазелин в сочетании с ланолином (9:1); эмульсионная основа (вазелин : эмульгатор Т₂: вода дистиллированная)) и гидрофильной (сплав полиэтиленоксидов (ПЭО); 5%-й глицероль натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ)) природы. Антимикробную активность мазей исследовали в опытах in vitro методом диффузии в агар (табл. 3).

Таблица 3

**Зависимость антимикробного действия метронидазола*
от вида мазевой основы**

№ гр.	Основы для мазей	Диаметр зоны задержки роста тест-штаммов, мм (M±m)					
		<i>S.aureus</i> 209 P	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	<i>B.cereus</i> ATCC 10702	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S.albicans</i> NCTC 2625
1	Вазелин	9,3±0,3	9,0±0,3	7,8±0,2	9,5±0,3	10,0±0,3	9,3±0,3
2.	Вазелин-ланолин	8,5±0,2	10,0±0,4	8,0±0,2	9,3±0,3	9,3±0,3	10,0±0,3
3.	Эмульсионная	10,3±0,3 ^{1,2}	10,0±0,4	9,3±0,3	9,3±0,3	10,6±0,3	8,8±0,3
4.	ПЭО	14,6±0,3 ^{1,2,3}	10,8±0,3 ^{1,2,3}	13,8±0,3 ^{1,2,3}	13,5±0,3 ^{1,2,3}	13,3±0,3 ^{1,2,3}	12,7±0,3 ^{1,2,3}
5.	5%-й глицероль NaКМЦ	14,8±0,3 ^{1,2,3}	10,1±0,3 ^{1,2,3}	12,8±0,3 ^{1,2,3}	13,7±0,3 ^{1,2,3}	12,1±0,3 ^{1,2,3}	11,3±0,3 ^{1,2,3}

Примечание: цифрами обозначены мазевые основы, в отношении которых различия достоверны (p<0,05), * концентрация метронидазола в мазях 0,5%

Установлено, что мази на гидрофильных основах в отношении всех изученных тест-штаммов обладают антимикробной активностью, так как диаметры зон задержки роста микроорганизмов увеличиваются в 1,5-2 раза относительно мазей, приготовленных на вазелиновой, вазелин-ланолиновой и эмульсионных основах. Кроме того, введение биоконплексов в состав мази также увеличивает ее антимикробную активность (табл. 4).

Для мазей с биоконплексами кобальта, меди и цинка с метронидазолом диаметр зоны задержки роста тест-микробов в среднем в 1,5 раза превышал показатели, полученные при использовании мази, содержащей метронидазол.

Наибольшей антимикробной активностью обладали мази, содержавшие комплексы цинка, кобальта, меди с метронидазолом в отношении *S.aureus*, *E.coli*, *B.subtilis*, *B.cereus*. Антимикробная активность мази, содержащей биоконплекс марганца с метронидазолом в отношении *S.aureus*, *B. subtilis* и *B.cereus*, незначительно отличалась от активности мази, содержащей метронидазол; в отношении *E.coli*, активность комплекса была почти в 2 раза больше, чем активность мази, содержащей метронидазол.

Таблица 4

Сравнительная оценка антимикробного действия мазей, приготовленных на основе полиэтиленоксида

Основной антимикробный компонент мази	Диаметр зоны задержки роста тест-штаммов, мм ($M \pm m$)					
	S.aureus 209 P	E.coli ATCC 25922	B.subtilis ATCC 6633	B.cereus ATCC 10702	P.aeruginosa ATCC 27853	C.albicans NCTC 2625
MN	14,6±0,3	10,8±0,3	13,8±0,3	13,5±0,3	13,3±0,3	12,7±0,3
MNZn	20,4±0,4	15,3±0,2	20,0±0,4	17,5±0,3	15,2±0,3	14,5±0,3
MNCo	19,1±0,4	16,5±0,2	19,3±0,4	19,8±0,4	14,8±0,2	16,2±0,3
MNCu	21,1±0,4	20,9±0,4	21,3±0,4	20,0±0,4	19,5±0,4	18,5±0,4
MNMn	15,8±0,3	18,3±0,2	16,4±0,3	16,1±0,2	16,8±0,2	15,7±0,2

Примечание: MN - метронидазол, MNZn - комплекс цинка с метронидазолом, MNCo - комплекс кобальта с метронидазолом, MNCu - комплекс меди с метронидазолом, MNMn - комплекс марганца с метронидазолом

В результате проведенных исследований установлено, что достаточной антимикробной активностью обладают 1-2%-е мази как метронидазола, так и его комплексных соединений, а основы, наиболее полно и быстро высвобождающие действующее вещество, - сплав полиэтиленоксидов с молекулярной массой 400 и 1500 в соотношении 8:2 соответственно и 5%-й глицерогель ИаКМЦ.

Введение в состав мазей тримекаина, спурилуны платенсис и аскорбиновой кислоты увеличивает их антибактериальную активность по сравнению с мазями, содержащими только биокомплексы.

Изучение терапевтической эффективности мазей с биокомплексами на модели полнослойной гнойной раны показало, что их применение быстро купировало воспалительный процесс, оказывало стимулирующее влияние на процессы восстановления поврежденной ткани. Это проявлялось в активизации образования демаркационной линии очага воспаления, более быстром развитии грануляционной соединительной ткани по сравнению с контролем. Подтверждением усиления процессов репаративной регенерации при использовании биокомплексов являются достоверно более ранние сроки образования струпа по сравнению как с контрольной группой, так и с группами, где использовалась мазь, содержащая метронидазол или применялась мазь «Левомеколь» (табл. 5).

Это сопровождалось уменьшением размеров кожной раны, более быстрым очищением ее от гноя и сокращением сроков начала образования грануляций. Причем мази, в состав которых, кроме биокомплексов были добавлены тримекаин, спурилуна платенсис и аскорбиновая кислота, стимулировали репаративные процессы достоверно быстрее по сравнению с аналогами.

Сроки заживления инфицированной раны у крыс при различных способах лечения

№ группы	Наименование группы	Сроки образования струпа, сутки.
1.	Контроль раны	14,2±0,2
2.	Лечение мазью, содержащей метронидазол	13,5±0,2 ¹
3.	Лечение мазью «Левомеколь»	13,5±0,2 ¹
4.	Лечение мазью, содержащей MNCu	12,5±0,2 ^{1,2,3}
5.	Лечение мазью, содержащей MNZn	12,0±0,2 ^{1,2,3}
6.	Лечение мазью, содержащей MNCo	12,0±0,2 ^{1,2,3}
7.	Лечение мазью, содержащей MNMn	13,0±0,2 ^{1,2,3}
8.	Лечение мазью, содержащей MNCu, тримекаин, спериулину, аскорбиновую кислоту	10,5±0,1 ^{1,2,3,4}
9.	Лечение мазью, содержащей MNZn, тримекаин, спериулину, аскорбиновую кислоту	10,0±0,2 ^{1,2,3,5}
10.	Лечение мазью, содержащей MNCo, тримекаин, спериулину, аскорбиновую кислоту	10,5±0,1 ^{1,2,3,6}
11.	Лечение мазью, содержащей MNMn, тримекаин, спериулину, аскорбиновую кислоту	11,5±0,2 ^{1,2,3,7}

Примечание: цифры надстрочного индекса обозначают номера групп, по сравнению с которыми наблюдается достоверные различия ($p < 0,05$)

Положительная динамика морфологических изменений в ране сопровождалась стимуляцией факторов антиинфекционной защиты. Начиная с 5 суток раневого процесса отмечались более высокие, чем в контроле, значения фагоцитарного числа, фагоцитарного индекса и завершенности фагоцитоза при использовании исследованных мазей. Это сопровождалось к концу опыта более высокими, чем в контроле, показателями стимулированного НСТ-теста при отсутствии разницы по спонтанному НСТ-тесту. Вследствие данного факта в опытных группах отмечались более высокие показатели функционального резерва фагоцитов. Различия по остальным исследованным параметрам антиинфекционной защиты были недостоверны. Однако следует отметить, что наибольшие значения указанных показателей отмечались при использовании мазей, содержащих дополнительно тримекаин, спериулину платенсис и аскорбиновую кислоту. Кроме того, наиболее выраженным иммуностимулирующим действием обладали мази, содержащие биокомплексы цинка и меди.

Таким образом, применение мазей, содержащих биокомплексы цинка, меди, кобальта и марганца с производным 5-нитроимидазола, позволяет получить хороший эффект при лечении гнойных раневых процессов стафилококковой этиологии. Введение в состав мазей дополнительно тримекаина, спериулины

платенсис и аскорбиновой кислоты усиливает их антимикробную активность и ранозаживляющее действие.

Исследования в области биохимии патологических процессов свидетельствуют о значительных изменениях в обмене и балансе микроэлементов на субклеточном, тканевом и организменном уровнях, своевременная коррекция которых, согласно экспериментальным и клиническим данным, может привести к хорошему терапевтическому эффекту. В связи с этим нами было изучено нарушение обмена биометаллов на модели инфицированной раны, представляющей форму патологии, сопровождающейся инфекционным воспалением и снижением иммунореактивности организма. При этом установлены значительные сдвиги в содержании цинка, марганца, меди и кобальта в крови и паренхиматозных органах экспериментальных животных по сравнению с показателями здоровых. Корреляционный анализ позволил установить парную корреляционную зависимость в крови животных. Прямая корреляционная зависимость выявлена для пар: цинк/кобальт, медь/марганец и обратная - цинк/медь, цинк/марганец, медь/кобальт (коэффициент корреляции в интервале от $\pm 0,75$ до $\pm 0,85$), что и послужило основой правомерности выбора пар элементов для расчета их коэффициентов соотношений.

В результате опытов была выявлена закономерность в изменении показателей соотношений элементов в крови и органах экспериментальных животных при моделировании инфицированной раны, заключающаяся в снижении коэффициентов соотношений цинк/медь, цинк/марганец и увеличении - медь/кобальт и медь/марганец.

Это подтверждает правомерность изучения не столько абсолютных уровней отдельных элементов, сколько отношений тех пар, которые близки по характеру участия в микроэлементном обмене и других биохимических процессах, но в то же время способны проявлять конкурирующие свойства в зависимости от целого ряда условий.

Основываясь на выявленных нарушениях топографии биометаллов в крови и органах, корреляционных зависимостях и показателях соотношений, представилось возможным в качестве объективного прогностического критерия при инфицированной ране выбрать соотношение цинк/медь, являющееся отражением реактивности организма при нарушении металлсмитандного гомеостаза.

Показано, что снижение показателя цинк/медь более чем в 4 раза свидетельствует о тяжести и неблагоприятном протекании инфицированной раны.

Установленные закономерности изменения уровней биометаллов и показателей их соотношений при инфицированной ране показали необходимость коррекции нарушенного металл-лигандного гомеостаза. С этой целью была изучена возможность использования нового координационного соединения цинка (И) с метронидазолом.



■ норма ■ I серия ■ II серия □ III серия

Рисунок 1. Динамика содержания биометаллов в крови экспериментальных животных при инфицированной ране (I серия – рана без лечения, II серия – рана+MN, III серия – рана+MNZn)

Анализ полученных результатов показал, что именно введение синтезированного биокомплекса при моделировании инфицированной раны способствует накоплению цинка в крови (рис. 1) и стремлению цинка к вероятностно-нормальному уровню в крови и к нормализации показателей выбранного соотношения. Гистологические исследования показали, что при введении данного нового биокомплекса отмечаются менее выраженные деструктивные процессы в паренхиматозных органах по сравнению с введением метронидазола.

Таким образом, проведенные исследования показали целесообразность коррекции металло-лигандного гомеостаза при инфицированной ране координационным соединением цинка (И) с метронидазолом, оказывающим эффективное ранозаживляющее действие, быстрое купирование воспалительного процесса и активизирующим иммунную систему.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что новые координационные соединения цинка, кобальта, меди и марганца с метронидазолом обладают более выраженным антимикробным действием в отношении тест-штаммов микроорганизмов по сравнению с метронидазолом.

2. На модели экспериментальной стафилококковой инфекции установлена высокая терапевтическая эффективность исследованных биокомплексов метронидазола с металлами, заключающаяся в снижении смертности животных при их инфицировании.

3. Комплексообразование цинка (II), кобальта (II), меди (II) и марганца (II) с метронидазолом приводит к усилению стимулирующего действия на факторы неспецифической резистентности (фагоцитоз, бактерицидная активность сыворотки крови), гуморального иммунного ответа; установлена низкая токсичность и отсутствие раздражающего эффекта изучаемых биокомплексов.

4. Обоснован состав и разработана технология мази, содержащей биокомплексы металлов (цинк, кобальт, медь и марганец) с метронидазолом (1%), местный анестетик тримекаин (3%), спинулину платенсис (1%), аскорбиновую кислоту (5%) и предназначенной для лечения местных гнойно-воспалительных процессов. Оптимальными основами из изученных в эксперименте являются полимерные, представляющие собой сплав полиэтиленоксидов с молекулярными массами 400 и 1500 в соотношении 8:2 соответственно и 5%-ый глицерогель ИаКМЦ.

5. На модели полнослойной кожной гнойной раны доказано, что разработанные мази, содержащие комплексные соединения цинка, кобальта, меди и марганца с метронидазолом обладают более выраженным, по сравнению с содержащей метронидазол мазью, антимикробным и ранозаживляющим действием. Показано, что многокомпонентная мазь, содержащая в своем составе кроме

биокомплексов тримекаин, спирулину платенсис и аскорбиновую кислоту, обладает высокой антимикробной и ранозаживляющей активностью.

6. Установлена возможность коррекции металло-лигандного гомеостаза координационным соединением цинка с метронидазолом в эксперименте на модели инфицированной раны.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Московцев СИ. Изучение антимикробной активности растворов некоторых биокомплексов производного 5-нитроимидазола в отношении аэробных микроорганизмов / СИ. Московцев, И.В. Рылина, Л.П. Лазурина // Матер. науч.-практ. конф. «Медицина будущего» - Краснодар, 2002. - С. 64.

2. Московцев СИ. Сравнительная характеристика антимикробной активности некоторых новых биокомплексов с металлами / СИ. Московцев, И.В. Рылина, Е.В. Цуканова // Сб. матер. Всеармейской науч.-практ. конф. с междунар. участием «Инфекция в хирургии - проблема современной медицины». - М., 2002. - С. 172-173.

3. Московцев СИ. Ранозаживляющая и иммуномодулирующая активность некоторых новых производных 5-нитроимидазола / СИ. Московцев, Л.П. Лазурина, В.М. Соломка // Сб. науч. раб. конф. «Актуальные проблемы медицины и биологии». - Томск, 2003. - С. 34.

4. Московцев СИ. К вопросу повышения эффективности лекарственных средств / СИ. Московцев, И.В. Самохвалова, А.А. Краснов, Л.П. Лазурина // Сб. матер. VI междунар. науч. конф. «Медико-экологические информационные технологии». — КурскГТУ, Курск, 2003. — С. 117-119.

5. Московцев СИ. Изучение биологической активности некоторых новых координационных соединений с металлами / СИ. Московцев, И.В. Самохвалова, А.А. Краснов, Л.П. Лазурина // Сб. матер. VI междунар. науч. конф. «Медико-экологические информационные технологии». - Курск, 2003. - С. 125-126.

6. Московцев СИ. Разработка антимикробных мазей на основе кохтатена / СИ. Московцев, А.А. Краснов, О.И. Басарева, Л.П. Лазурина, В.М. Соломка // Сб. науч. тр. междунар. науч.-практ. молодеж. конф. молодых ученых и специалистов «Социально-экономическое развитие регионов: реальность и перспективы». - Воронеж, 2003. - С. 103.

7. Московцев СИ. Антимикробная активность мазей, содержащих некоторые производные 5-нитроимидазола / СИ. Московцев, А.А. Краснов, Л.П. Лазурина // Сб. науч. тр. междунар. науч.-практ. молодеж. конф. молодых ученых и специалистов «Социально-экономическое развитие регионов: реальность и перспективы». - Воронеж, 2003. - С. 105.

8. Московцев СИ. Изучение ранозаживляющего действия многокомпонентных мазей, содержащих биокомплексы металлов / СИ. Московцев,

И.В. Самохвалова, А.А. Краснов, Л.П. Лазурина, Н.А. Корневский // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. - 2003. - Т. 2, № 3. - С. 225-227.

9. Московцев С.И. Разработка многокомпонентных мазей, содержащих новые биокомплексы, для лечения гнойной инфекции / С.И. Московцев, И.В. Самохвалова, А.А. Краснов, Л.П. Лазурина // Сб. матер. VI междунар. науч. конф. «Медико-экологические информационные технологии». - Курск, 2003. - С. 127-129.

10. Московцев С.И. Антимикробная активность некоторых биокомплексов с металлами / С.И. Московцев, Л.П. Лазурина, В.М. Соломка // Сб. матер. Всерос. науч.-практ. конф. «Новые медицинские технологии в охране здоровья здоровых, в диагностике, лечении и реабилитации больных. - Пенза, 2003. - С. 78-79.

11. Московцев С.И. Антимикробная активность многокомпонентных мазей, содержащих новых биокомплексы / С.И. Московцев, А.В. Завьялов, Л.П. Лазурина, В.М. Соломка, И.В. Самохвалова // Сб. науч. тр. межрегион. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы формирования и обеспечения здорового образа жизни, сохранения, укрепления и восстановления здоровья населения». - Липецк, 2003. - С. 153.

12. Московцев С.И. Сравнительная характеристика антимикробной активности спирулина платенсис и аскорбиновой кислоты / С.И. Московцев, А.В. Завьялов, Л.П. Лазурина, В.М. Соломка, И.В. Самохвалова // Сб. науч. тр. межрегион. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы формирования и обеспечения здорового образа жизни, сохранения, укрепления и восстановления здоровья населения». - Липецк, 2003. - С. 153-154.

13. Московцев С.И. Изучение токсичности некоторых новых биокомплексов с металлами / С.И. Московцев, И.В. Самохвалова // Матер. науч. конф. «Вклад земляков-орловцев в развитие и становление Российской науки, культуры и образования». - Орел, 2003. - С. 52-53.

14. Московцев С.И. Эффективность терапии раневой инфекции многокомпонентными мазями, содержащими новые биокомплексы / С.И. Московцев, И.В. Самохвалова // Матер. науч. конф. «Вклад земляков-орловцев в развитие и становление Российской науки, культуры и образования». - Орел, 2003. - С. 53-54.

15. Московцев С.И. Изучение влияния комплексных соединений цинка, меди, кобальта и марганца с производным 5-нитроимидазола на антимикробную активность мазей / С.И. Московцев, И.В. Самохвалова, Л.П. Лазурина, Н.А. Корневский, А.А. Краснов // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. - 2003. - Т. 2, № 4. - С. 326-327.

16. Московцев С.И. Методические рекомендации по изготовлению, контролю качества и использованию мазей на полимерных основах, содержащих

метронидазол и биокомплекс цинка с метронидазолом / СИ. Московцев, Л.П. Лазурина, И.В. Самохвалова, В.М. Соломка, Е.В. Каштанова. — Курск: КГМУ, 2004 - 8 с.

Лицензия ЛР № 020862 от 30.04.99 г.

Сдано в набор 16,08.2004 г. Подписано в печать 20,08.2004 г.

Формат 30x421/₈ Бумага офсетная. Гарнитура Times New Rom.

Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,0.

Тираж 100 экз. Заказ № 48А.

Издательство Курского государственного медицинского университета
305041, г. Курск, ул. К. Маркса, 3.

04 - 15723