



003485184

НА ПРАВАХ РУКОПИСИ

Гусоева Олеся Валерьевна

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
ПРИМЕНЕНИЯ НАРУЖНЫХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ
МЕТРОНИДАЗОЛА ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ВОСПАЛЕНИИ**

**14.00.25 – ФАРМАКОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ
ФАРМАКОЛОГИЯ**

**АВТОРЕФЕРАТ
ДИССЕРТАЦИИ
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА МЕДИЦИНСКИХ НАУК**

КУРСК - 2009

26 НОЯ 2009

Работа выполнена в ГУ «Научный центр биомедицинских технологий» Российской Академии Медицинских Наук

Научные руководители:

доктор биологических наук **Сергиенко Аэлита Валерьевна**
доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент
РАМН **Каркищенко Николай Николаевич**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный деятель
науки РФ **Резников Константин Михайлович**

доктор медицинских наук, профессор

Яворский Александр Николаевич

Ведущая организация:

ГОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет
Федерального агентства по здравоохранению и социальному
развитию»

Защита состоится «11» декабря 2009 г. В 13³⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 208.039.03 при Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Курский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (305041, г. Курск, ул. К. Маркса,3).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО КГМУ Росздрава.

Автореферат разослан «10» ноября 2009г.

Учёный секретарь
диссертационного совета

Пашин Е.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

В настоящее время, несмотря на появление новых, все более эффективных препаратов, методов лечения и диагностики, и все большую осведомленность населения относительно дерматологических заболеваний, не наблюдается значительного снижения общего количества больных дерматозами различной этиологии. Поэтому очень остро стоят проблемы эффективности и доступности дерматопротекторной терапии и профилактики дерматологических заболеваний и их осложнений. При осложненных инфекциях рекомендуются препараты группы нитроимидазола. Родоначальником препаратов нитроимидазольной структуры, не потерявшим свою значимость, и по сей день является метронидазол - один из высокоактивных лекарственных препаратов с выраженным влиянием на смешанные инфекции, осложненные анаэробными инфекциями. По данным ВОЗ (2001 г.), однократный прием 2,0 г этого препарата приводит к излечению у 88% дерматовенерологических больных [Inceboz T., 2004, Европейские стандарты диагностики и лечения заболеваний, передаваемых половым путем., 2006.; Забиров, К., 2008г.].

Комплексное применение метронидазола с иммуномодулирующими и антисептическими препаратами в настоящее время является актуальной и широко дискутируемой проблемой [А.А. Кубанова, 2006, Шестопапов А.Е., 2005г.]. В частности, имеются клинически доказанные и экспериментально обоснованные факты целесообразности сочетания метронидазола с полиоксидонием и хлоргексидином в стоматологии и хирургии для купирования воспаления [Нисанова С. Е., 2009г, Завадский Р.В. 2008г.].

В связи с этим очевидный практический интерес представляют препараты, активные в отношении анаэробных микроорганизмов, и среди них новые разрабатываемые отечественные лекарственные

формы уже известных препаратов: аэрозоль нитазола, раствор метронидазола [Нисанова С. Е., 2009г.].

Не достаточно изучена возможность использования метронидазола в наружных лекарственных формах комбинированного состава. В доступной литературе сведений о сочетании метронидазола с микробиологическим β -каротином в виде мазевой композиции и препаратов, аппретированных на волокнистых материалах для нужд современной дерматологии нет. Это послужило основой для комплексирования метронидазола с β -каротином.

В этой связи, изучение биологической активности предлагаемых наружных лекарственных форм метронидазола – олеогеля и тканевых аппретов представляется особенно актуальным и перспективным.

С появлением новых методов анализа, технологии, биомоделирования многие лекарственные препараты, давно и хорошо изученные, вновь привлекают внимание ученых в связи с открывающимися возможностями их применения [Каркищенко Н.Н., 2008]. Комплексирование метронидазола с препаратами других фармакологических групп с разным механизмом действия (каротиноиды, антисептики) способно обеспечить потенцированный синергизм, что позволит снизить дозу и лекарственную нагрузку на организм при оптимизации фармакологического эффекта [Сергиенко А.В., Ивашев М.Н. 2007г., Сергиенко В.Б. 2006г.]. В практической медицине традиционно достаточно одностороннее применение препарата метронидазола не позволяет полностью использовать его скрытые резервы фармакологического эффекта при экономической доступности. В литературе недостаточно данных об использовании метронидазола в качестве дерматопротекторного лекарственного средства при неинфекционных воспалениях кожи. В настоящем исследовании ставится проблема изучить метронидазол и его комплексные варианты с микробиологическим β -каротином и антисептиком хлоргексидином на заживление ран и воспалительных процессов инфекционной и неинфекционной этиологии в коже экспериментальных животных и провести оценку кинетики в

очаг воспаления. Для своевременной диагностики и терапии воспалительного процесса независимо от его топографии и стадии необходимы фармакологически активные средства с максимальной фиксацией в воспалительном очаге и в этом плане метронидазол перспективен.

Лекарственные формы метронидазола: таблетки, суппозитории вагинальные, раствор для инфузий; гель для местного применения представлены преимущественно зарубежными производителями. Импортные медикаменты отличаются высоким не только качеством, но и ценой. Метронидазол (дженерик) и микробиологический β -каротин – субстанции отечественного производства. На их основе были изготовлены лабораторные образцы наружных лекарственных форм: геля на липофильной основе и аппреты на тканевом носителе. Актуальность исследований связана с необходимостью создания отечественных наружных лекарственных средств, обладающих дерматотропной активностью комбинированных по составу с поливалентным механизмом действия, проявляющих противовоспалительный, ранозаживляющий и антибактериальный эффект.

Исследования по фармакологическому изучению мазевой композиции (олеогеля) метронидазола с микробиологическим β -каротином и тканевых аппретов с метронидазолом, хлоргексидином и β -каротином актуально, своевременно и перспективно.

Цель исследования

Фармакологическое обоснование применения наружных лекарственных форм метронидазола с микробиологическим β -каротином: геля и тканевых аппретов при моделированном воспалении.

Задачи исследования

1. Установить противовоспалительную активность мазевой композиции (олеогеля) и тканевых аппретов метронидазола с микробиологическим β -каротином на острое экссудативное воспаление, индуцированное инъекцией каррагинина и асептическое субхроническое воспаление кожи, индуцированное имплантацией под кожу

- ватного шарика. Изучить кинетику метронидазола в воспалительный очаг крыс с применением радиологических методов.
2. Изучить ранозаживляющую активность мазевой композиции (олеогеля) метронидазола с микробиологическим β -каротином и тканевых аппретов метронидазола с β -каротином и хлоргексидином по влиянию на заживление термического повреждения кожи крыс и кроликов на модели ожоговой раны по снижению ее площади и на модели линейной кожной раны тензиометрически.
 3. Экспериментально изучить фармакотерапевтическую эффективность мазевой композиции (олеогеля) и тканевых аппретов метронидазола с β -каротином в отношении лабораторных штаммов бактерий *in vitro* (метод серийных разведений, метод диффузии в агар) и *in vivo* на моделях гнойных ран у кроликов, инфицированных госпитальными штаммами, выделенными из патологического материала больных с гнойно-воспалительными процессами.
 4. Изучить токсикологические свойства изучаемых наружных лекарственных форм метронидазола с микробиологическим β -каротином: мазевой композиции (олеогеля) и тканевых аппретов, на лабораторных животных: острая токсичность *in vivo* на мышцах, степень раздражающего действия *in situ* ХЕТ КАМ - тестом на куриных эмбрионах, *in vivo* на переднем сегменте глаза млекопитающих; тканевых аппретов *in vivo* методом Draize-test кроликах (кожная проба).

База для проведения исследований

ГУ Научный центр биомедицинских технологий РАМН (г. Москва); Пятигорская государственная фармацевтическая академия (г. Пятигорск); Научно - производственный кардиологический комплекс (г. Москва). Тема диссертационной работы утверждена в ГУ Научный центр биомедицинских технологий РАМН 15 декабря 2008 года, протокол №10.

Научная новизна исследований

Впервые выявлена противовоспалительная, ранозаживляющая, антибактериальная активность комплекса, заключенного в липофильный гель, содержащий метронидазол, микробиологический β -каротин и жирные полиненасыщенные кислоты.

Впервые изучено и предложено сочетание метронидазола и микробиологического β -каротина с хлоргексидином, обладающее выраженным противоожоговым, противовоспалительным и антимикробным действием, оформленное в тканевые аппреты. Экспериментально установлен оптимальный образец ткани для изготовления аппретов с оптимальными адсорбционными свойствами – лигниновое полотно.

Научно - практическая значимость исследования

- Результаты проведенного фармакологического изучения комплексных лекарственных форм метронидазола с микробиологическим β -каротином (олеогель), метронидазола с микробиологическим β -каротином и хлоргексидином (тканевые аппреты) в условиях экспериментальной патологии, свидетельствуют о выраженном противовоспалительном, противоожоговом, ранозаживляющем, антимикробном действии предлагаемых лекарственных средств, указывают на перспективность их применения в терапии воспалительных заболеваний в дерматологии и хирургии.
- Способность метронидазола накапливаться в зоне воспаления, установленная радиобиологическим методом, дает возможность использовать его в медицинской практике, как с целью диагностики, так и мониторинга терапии воспалительных процессов в дерматологии.

Объем и структура диссертации

Работа выполнена на 131 стр. текста компьютерного набора, иллюстрирована 27 таблицами, 6 рисунками. Состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований. Список цитируемой литературы содержит 194 источника литературы, из которых 44 иностранных источников.

Апробация и публикация результатов исследования

Основные положения диссертационной работы доложены на XV, Российском национальном конгрессе "Человек и лекарство", (г. Москва, 2008г.), на 63 ежегодной конференции по фармации, фармакологии и подготовке кадров (г. Пятигорск, 2008г.); на Конгрессе иммунологии и аллергологии (г. Паттайа, Таиланд, 2007г.); на международной конференции «Физиология и патология иммунной системы», IV Международной конференции по иммунотерапии, (г.Москва, 2008г.).

Публикации

По теме кандидатской диссертации опубликовано 7 научных работ, 3 из которых входят в журналы, рекомендованные ВАК.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось с 2006 по 2009 год в Научном Центре биомедицинских исследований (г. Москва) и Пятигорской государственной фармацевтической академии (г. Пятигорск). Для решения поставленных задач использовался комплекс современных и модифицированных методик, что позволило исследовать наружные лекарственные формы метронидазола на экспериментальное воспаление кожи различного генеза, получить количественные и динамические характеристики. Острое экссудативное воспаление моделировали введением 1% р-ра каррагинина в количестве 0,1 мл субплантарно дорсовентрально в правую заднюю конечность крыс. Противовоспалительную эффективность исследуемых образцов мазей рассчитывали по формуле [Тринус Ф.П., 1985г., Мотов А.А. 2005г.]:

$$P = \frac{v_k - v_0}{v_k} \cdot 100 \%;$$

где: P – процент угнетения воспаления, v_k – среднее увеличение объема отежной лапки в контроле, v_0 – среднее увеличение объема отежной лапки у леченых животных.

Субхроническое пролиферативное воспаление моделировали имплантацией инородного тела под кожу мышей – ватной гранулемы массой 15 мг. Олеогель наносили животным накожным способом, не втирая ежедневно в течение 7 дней. О величине экссудативной фазы воспаления судили по разнице в массе (мг) шарика до и после высушивания, о величине пролиферативной фазы – по разнице в массе (мг) высушенного шарика и его исходной массы. [Фисенко В.П, 2000].

Кинетику метронидазола определяли, интегрируя каолиновое воспаление, имплантацию ватного шарика и радиоизотопные методы: скинтиграфия и прямая радиометрия очага воспаления крыс.

Ранозаживляющая активность олеогеля и аппретов оценивалась по следующим параметрам: тензиометрия линейной раны кожи крыс; скорость заживления и площадь ожогового повреждения, моделированного контактным методом. Антибактериальная активность олеогеля и аппретов оценивалась *in vitro* методом диффузии в агар (для оценки активности олеогеля применяли метод колодцев, для оценки активности аппретов применяли метод тканевых дисков); серийных разведений и *in vivo* моделированием гнойных ран кроликов с использованием госпитальных штаммов микроорганизмов. Токсикологическую оценку олеогеля определяли по раздражающей активности на куриных эмбрионах, на переднем сегменте глаза морских свинок и аппретов скарификацией кожи кроликов, атрибутом острой токсичности и ЦНС-токсичности олеогеля метронидазола на мышах. Препараты сравнения из разных фармакологических групп были выбраны не случайно, с целью продемонстрировать широкий фармакодинамический диапазон олеогеля и тканевых аппретов: мазь индометацина (Balcanpharma, Болгария), мазь метилурацила 10% производства «Нижфарм» (Россия), облепиховое масло жидкое производства "Алтайвитамины" (Россия), мазь Клион (Гедеон Рихтер, Венгрия)

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием т-критерия Стьюдента, в пакете компьютерной программы Microsoft Excel Ver 9, 2000

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

По результатам предпочтений дерматологов, полученных на основании опроса врачей и изучения медицинского документооборота, наиболее эффективные препараты, имеющие перспективный спрос и благоприятную конъюнктуру были включены в рациональный комплекс, который был заключен в лекарственные формы – липофильный гель и тканевые аппреты, что и стало объектом для дальнейших экспериментальных исследований.

Официально выпускаемые каротины - содержащие препараты – облепиховое масло, масло шиповника и калины и др. [А.Н.Богданов, 2008] являются суммарными, не имеют общих методов стандартизации и зависят от сорта растительного сырья и качества растительного масла, используемого в качестве растворителя. Использование растительных источников каротинов зависит от различных факторов: сезонность, территория произрастания растительных объектов, сорт. При применении этих лекарственных форм сложно контролировать точность дозирования. Доступность, дешевизна, освоенный промышленностью выпуск, безотходная технология, высокая фармакологическая активность микробиологического β-каротина говорит в пользу расширения его использования в медицинской практике.

ТАБЛИЦА 1 - РЕЗУЛЬТАТЫ ПРЕДПОЧТЕНИЙ ДЕРМАТОЛОГОВ КМВ

- **МЕТРОНИДАЗОЛ, РУЛИД, АЦИКЛОВИР, ЛЕВОМИЦЕТИН, ЦЕФАЛЕКСИН, СОЛКОДЕРМ, Р-Р САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ, ИОДА, КАРОТИНЫ СОДЕРЖАЩИЕ ПРЕПАРАТЫ, ЛАМИЗИЛ, НИЗОР АЛ, ХЛОРГЕКСИДИН** - наиболее эффективные ЛС, имеющие перспективный спрос и благоприятную конъюнктуру.
- **РИБАВИРИН, КЕТОКОНАЗОЛ, МИКОСЕПТИН, ОРУНГАЛ, НИСТАТИН, РОАКУТАН, ФТОРОКОРТ, ГИДРОКОРТИЗОН** - достаточно эффективные, но имеющие неблагоприятную конъюнктуру, тенденции стабилизации или снижения спроса.
- **АЛПИЗАРИН, УНДЕЦИН, КЛАЦИД, МИКОЗОЛОН, ЗИНЕРИТ, АЗЕЛАЙНОВАЯ КИСЛОТА** - не пользуются спросом, либо же имеют серьезные побочные эффекты.

РАЦИОНАЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС

*Кафедра СЭФ ПятГФА, проф. В.В. Гацян 2007г.
Кафедра УЭФ ФПО ПятГФА, проф. С.А. Парфевников 2008г.*

Лабораторные образцы лекарственных форм: мазевая композиция (олеогель), гель – плацебо, тканевые аппреты были изготовлены под руководством доктора фармацевтических наук, профессора кафедры технологии лекарств Пятигорской государственной фармацевтической академии (г.Пятигорск). Э.Ф. Степановой и доктора биологических наук, кандидата фармацевтических наук, профессора кафедры фармакологии Пятигорской государственной фармацевтической академии (г.Пятигорск) А.В.Сергиенко. Олеогель с метронидазолом и тканевые аппреты содержат β -каротин, полученный методом микробиологического синтеза из триспоровых грибов *Blakeslea trispora* и комплекс жирных полиненасыщенных кислот. Раствор β -каротина в растительном масле в концентрации 1% известен под торговым наименованием «Каролин» и применяется в качестве источника провитамина А β -каротина. Тканевые аппреты представляют собой салфетки размером 9x12 см, пропитанные 0,5% водным раствором метронидазола, 0,5% водным раствором хлоргексидина и масляным раствором β -каротина. Олеогель представляет собой желеобразную мазевую композицию с характерным для β -каротина оранжевым оттенком, легко наносится на кожу.

ТАБЛИЦА 2 - СОСТАВ ПРЕДЛАГАЕМЫХ НАРУЖНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ МЕТРОНИДАЗОЛА

СОСТАВ ГЕЛЯ: НА 100 г	СОСТАВ ТКАНЕВЫХ АППРЕТОВ (НА 1 САЛФЕТКУ):
Метронидазол – 1%	Ткань размером 9x12 см.
0,1 % Масляный раствор β -каротина (Каролин) – 0,1%	Хлоргексидина биглюконата 0,5% р-р водный - 1,6 мл
Бутилоксиголуол – 0,01%	Метронидазол 0,5% р-р водный – 1,6 мл
Аэросил 12,94 %	Раствор 0,1 % микробиологического β -каротина в растительном масле (Каролин)
Масло растительное 85,95%	0,008 – 0,011 мл

Противовоспалительную активность олеогеля определяли по двум моделям: острое экссудативное воспаление с использованием каррагенинового отека конечности крыс и субхроническое экссуда-

тивно-пролиферативное воспаление с применением имплантации инородного тела под кожу мышей (ватная гранулема). На модели каррагенинового отека изучали противозксудативное действие олеогеля по динамике объема лапки крысы через 3 часа и через сутки после индукции. Прирост объема лапки составлял степень выраженности эксудации. Начальный объем лапки животных с моделированным отеком, не получившими лечения составил 1,01 мл, через 3 часа 1,61 мл, окончательный объем лапки 1,16 мл. Прирост объема лапки нелеченных животных составил через 3 часа $0,6 \pm 0,02$, через сутки прирост объема лапки от начального объема составил $0,15 \pm 0,01$ мл. Основа геля (плацебо) практически противозксудативного действия не оказала, прирост объема лапки составил $0,5 \pm 0,02$ мл через 3 часа и 0,15 в конце эксперимента (через сутки). Исследуемый олеогель метронидазола с β -каротином проявил выраженное противозксудативное действие: снижение стадии эксудации отмечалось как через 3 часа, так и через сутки после индукции экспериментального воспаления. Через 3 часа эксперимента действие олеогеля метронидазола с β -каротином обеспечило выраженное достоверное угнетение эксудативной фазы воспаления: отек был на 30,34% меньше, чем в контроле (нелеченные животные). А через сутки этот показатель был меньше показателя контрольной группы (нелеченные животные) на 16,01% ($p < 0,05$). Этот результат не отличался достоверно от показателей группы сравнения (мазь индометациновая) через 3 часа прирост объема лапки составил в этой группе 15,31%, что достоверно отличалось от показателей нелеченных животных на 44,1% и не отличалось достоверно от показателей опытной группы, получившей гель метронидазола с β -каротином (разница 13,76%).

При использовании изучаемого олеогеля метронидазола с β -каротином на фоне моделированного эксудативного воспаления крыс наблюдалась положительная динамика всех симптомов моделированной воспалительной реакции: кроме достоверного снижения отека,

отмечалось снижение гиперемии и нормализация температуры воспаленной конечности крысы. Таким образом, изучаемая многокомпонентная наружная лекарственная форма проявила выраженный противовоспалительный эффект, достоверно не отличаясь от классического противовоспалительного препарата – мази индометациновой.

ТАБЛИЦА 3 -ДИНАМИКА ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТЕКА, ПОЛУЧЕННАЯ ПО ОБЪЕМУ ВЫТЭСНЕННОЙ ВОДЫ В АБСОЛЮТНЫХ ЕДИНИЦАХ (МЛ)

Группы животных	Объем лапки исходный	% Р	Объем лапки через 3 часа	Объем лапки через сутки
Нелеченные животные, n=6	1,01±0,05		1,61±0,2	1,16±0,05
Животные, получившие изучаемый гель, n=6	0,86±0,03	14,85 p>0,05	1,11±0,2	0,85±0,05
Животные, получившие гель-плацебо n=6	0,87±0,03	13,86 p>0,05	1,39±0,03	1,02±0,05
Животные, получившие мазь индометациновую n=6	0,98±0,03	-2,97 p>0,05	1,13±0,03	0,96±0,03

Р – показатель достоверности отличий к объему лапок на исходном уровне к группе нелеченных животных (контроль); % - к показаниям нелеченных животных; n= количество животных

Для оценки степени выраженности противовоспалительного эффекта необходимо было рассчитать индекс противовоспалительной эффективности изучаемого олеогеля, геля-плацебо и препарата сравнения. Индекс противовоспалительной эффективности исследуемых образцов мазей составила:

$$Р \text{ геля метронидазол+каролин} = [(0,6-0,25)/0,6] * 100\% = 58,33\%$$

$$Р \text{ гель-плацебо} = [(0,6-0,5)/0,6] * 100\% = 16,67\%$$

$$Р \text{ мази индометацина} = [(0,6-0,15)/0,6] * 100\% = 75,0\%$$

Противовоспалительная активность мазевой композиции (олеогеля) 58,3% обеспечивается входящими в него компонентами, что объясняется тем, что гель-плацебо проявил меньшую эффективность в 3,49 раза. Результаты представлены на рисунках 1 и 2.

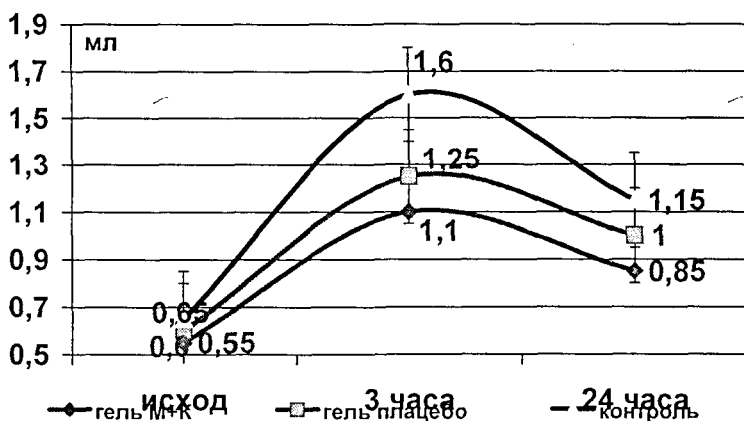


РИСУНОК 1 - ВЛИЯНИЕ ОЛЕОГЕЛЯ НА ЭКССУДАТИВНУЮ СТАДИЮ ОСТРОГО ВОСПАЛЕНИЯ КОНЕЧНОСТИ КРЫС (КАРРАГЕНИНОВЫЙ ОТЕК)

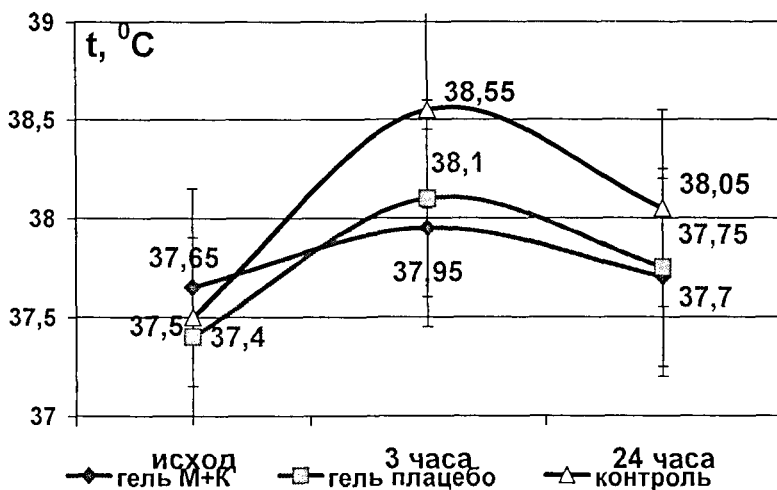


РИСУНОК 2 - ВЛИЯНИЕ ОЛЕОГЕЛЯ НА ДИНАМИКУ ТЕМПЕРАТУРЫ ПРИ ОСТРОМ ВОСПАЛЕНИИ КОНЕЧНОСТИ КРЫС (КАРРАГЕНИНОВЫЙ ОТЕК)

Для моделирования субхронического воспаления кожи мышей использовали модель cotton pellet - имплантации инородного тела под кожу в асептических условиях. Результаты см. таблица 4.

ТАБЛИЦА 4 -ВЫРАЖЕННОСТЬ СТАДИИ ЭКССУДАЦИИ И ПРОЛИФЕРАЦИИ

Группы животных	Стадии воспаления			
	экссудация	%	пролиферация	%
Нелеченные животные, n=6	46,8±0,4	100%	9,3±0,21	100%
Животные, получившие изучаемый олеогель, n=6	36,7±0,3	78,41%	7,3±0,22	75,38%*
Животные, получившие олеогель-плацебо n=6	40,5±0,2	86,54%	11,07±0,18	119,03%
Животные, получившие мазь индометациновую n=6	37,2±0,3	79,49%*	7,01±0,11	78,49%*

Примечание: Высушивание шарика до постоянной массы проводили в сушильном шкафу при (t 50 °С).

* - достоверность к контролю (нелеченные животные).

На 8е сутки после ежедневного нанесения олеогеля метронидазола с β-каротином, олеогеля-плацебо и препарата сравнения (мазь индометациновая) на кожу спинки мышей ватный шарик с образовавшейся вокруг него грануляционной тканью был извлечен под общим наркозом. У контрольной группы животных, которыми являлись мыши с моделированным воспалением, но не получившими препарат, также были извлечены шарики. Сразу после извлечения шарики взвешивали, затем после достижения ими постоянной массы взвешивали повторно. У контрольной группы (нелеченные животные) экссудативный компонент асептического воспаления составлял 46,7±2,9 мг, а пролиферативный компонент 9,3±0,8 мг. Результаты контрольной группы животных были приняты за 100%. При нанесении на кожу мазевой композиции (олеогеля) метронидазола и β-каротина в течение 7 суток степень экссудации понижалась на 21,2% (p<0,05), а интенсивность пролиферативного процесса уменьшалась на 24,7% (p<0,05) по

сравнению с животными, не получившими лекарственную форму. У мышей, получивших основу-плацебо также наблюдалось некоторое понижение экссудации на 14,3% ($p > 0,05$), интенсивность пролиферативного процесса, напротив, увеличивалась на 18,3% ($p < 0,05$) по сравнению с животными, не получившими лекарственную форму. Официальный препарат - мазь индометациновая 10% обусловила снижение экссудации на 20,3% ($p < 0,05$), а пролиферации на 21,5% ($p < 0,05$). Результаты олеогеля существенно не отличались по своей эффективности от препарата сравнения.

Для определения кинетики метронидазола в очаге воспаления использовали радиологические методы исследования. Было визуализировано острое экссудативное и пролиферативное воспаление в статике и динамике с применением меченого технеция методами *in vivo*, *in vitro*. В эксперименте учитывались такие показатели воспаления, как отек, гиперемия, температура тела крыс до введения каолина и через 24 часа после введения каолина. У животных серии метронидазол средняя температура была 37,6 °С до введения каолина и 38,2 °С после введения каолина соответственно; у животных серии индометацин средняя температура была 37,8 °С до введения каолина и 38,9 °С после введения каолина. Через 24 часа животным внутривенно вводили радионуклидные препараты в хвостовую вену. Через 90 минут после введения радионуклидного препарата животное фиксировали и помещали в камеру для проведения компьютерной сцинтиграфии. После этого, в воспаленной и здоровой конечностях измеряли радиоактивность по γ -излучению. От показателей излучения отнимали показания фона и делили на объем лапы. Находили коэффициент накопления γ -лучей в нормальной и воспаленной лапке. Метронидазол показал коэффициент накопления γ -лучей 1006,7, тогда как препарат сравнения индометацин 136,7. Таким образом, радиобиологически было установлено, что антипротозойный препарат метронидазол, являющийся производным нитроимидазола, обнаружил включение в зону воспаления, что объясняет его противовоспалительные свойства.

Следующим этапом исследования явилось определение ранозаживляющей и репаративной активности олеогеля.

Оценивали лечебное действие мазевой композиции (олеогеля) на модели линейной кожной раны крыс. У животных, не получивших лекарственную форму прочность рубца при ранотензиометрическом испытании составляла $4,0 \pm 0,34$ Н. При нанесении олеогеля с β -каротином и метронидазолом прочность рубца линейной кожной раны увеличилась: нагрузка разрыва повысилась на 34,24% ($p < 0,05$), что в 1,19 раза превосходило тензиометрическую характеристику рубца в случае применения ранозаживляющего препарата сравнения, содержащего растительные каротиноиды - облепиховое масло жидкое. По степени выраженности противоожогового эффекта косвенно судили о репаративной активности олеогеля при комбустиозной патологии эпителиальной ткани.

При исследовании олеогеля на наличие противоожоговой активности на модели термического ожога, вызванного контактным способом, установлено следующее. У контрольной группы, которыми являлись животные, не получившие изучаемую лекарственную форму, ожоговое повреждение, вызванное контактным способом на 2-е сутки имело площадь раны в весовых единицах $2,8 \pm 0,25$ мг, а на 8-е сутки $2,5 \pm 0,25$ мг, что было принято за 100%.

Применение геля уменьшило площадь ожогового повреждения: на 2-е сутки площадь раны составила 46,4%, то есть разница по сравнению с контролем была на 53,6% ($p < 0,05$), а на 8-е сутки площадь раны составила 36,0%, разница с контролем на 64,0% ($p < 0,01$). У животных, получивших основу геля (плацебо) отмечалось понижение общей площади раны на 2-е сутки на 39,3% ($p < 0,001$), площадь при этом составила 60,7%, на 8-е сутки площадь ожога 56,0%, а разница на 44,0% ($p < 0,05$) по сравнению с нелечеными животными. Это было статистически достоверно ниже, чем в опытах с олеогелем. Мазь метилурациловая снижала на 2-е сутки площадь ожоговой поверхности лишь на 42,9% ($p < 0,05$) а на 8-е сутки на 56,0% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Таким образом, противоожоговый эффект геля превосходил действие мази метилурациловой и этот эффект обусловлен комплексированием действия метронидазола и β -каротина.

ТАБЛИЦА 5 - ВЛИЯНИЕ ГЕЛЯ С МЕТРОНИДАЗОЛОМ И β -КАРОТИНОМ НА ПЛОЩАДЬ ОЖОГОВОЙ РАНЫ КРЫС

Группы животных	Площадь раны в весовых единицах, мг					
	2 ^е сутки			8 ^е сутки		
	M±m	P	%	M±m	P	%
Контроль, n=6	2,8±0,25		100,0	2,5±0,25		100,0
гель n=6	1,3±0,15	P ₁ <0,05 P ₂ <0,05 P ₃ <0,05	46,4	0,7±0,04	P ₁ <0,01 P ₂ <0,01 P ₃ <0,05	36,0
Гель плацебо, n=6	1,7±0,15	P ₁ <0,01	60,7	1,4±0,34	P ₁ <0,05	56,0
мазь метилурациловая n=6	1,6±0,27	P ₁ <0,05	57,1	1,1±0,12	P ₁ <0,05	44,0

Примечание: P₁ – вероятность различия к контролю; P₂ – к животным, получившим основу; P₃ – к животным, получившим метилурациловую мазь.

Перед исследованием фармакологической активности тканевых аппретов целесообразно было провести оценку тканевого носителя. Для определения тканевого носителя с лучшей высвобождающей способностью, провели скрининговые исследования с участием разных образцов тканей на высвобождение веществ, которыми пропитывали образцы ткани. Степень высвобождения определяли по диаметру окрашенной зоны, проникшей в агаровый гель без посева микроорганизмов. Проведенные сравнительные исследования позволяют предложить лигниновое полотно как наиболее оптимальную ткань в плане высвобождения данной лекарственной композиции.

Противоожоговая и антибактериальная активность тканевых аппретов изучалась на модели ожогового повреждения кожи кроликов (температура 100 °С, время экспозиции 20 сек.). Оценивали площадь ожогового повреждения на 2е и 8е сутки после ежедневной смены повязки. У контрольной группы кроликов, (животные, не получившие лекарственную форму), ожоговое повреждение на 2-е сутки имело площадь раны в весовых единицах 3,48±0,20 мг, а на 8-е сутки 2,98±0,15 мг, что было принято за 100%. Применение тканевого аппрета с метронидазолом, Каротином и хлоргексидином уменьшило общую площадь ожогового повреждения на 2-е сутки на 40,52% (p<0,05) и составило 59,48%, а на 8-е сутки уменьшило на

62,75% ($p < 0,05$), по сравнению с контролем, что составило 37,25% от контроля. У животных, получивших тканевой аппрет с мазью метилурациловой, отмечалось уменьшение площади ожоговой поверхности на 2-е сутки на 33,99% ($p < 0,05$), составило 66,09% от контроля, а на 8-е сутки на 42,95% ($p < 0,05$), составило 57,05% от контроля. Изучение антибактериальных свойств олеогеля и аппретов в сравнении с препаратом Клион проводили методом серийных разведений в отношении лабораторных штаммов бактерий и штаммов, выделенных из патологического материала больных с гнойно-воспалительными процессами. В этих исследованиях использовали лабораторные образцы тканевых пропиток с метронидазолом, β -каротином, хлоргексидином и олеогель метронидазола с β -каротином в сравнении с зарубежным препаратом.

В отношении стафилококков и кишечной палочки комбинированный олеогель с метронидазолом, β -каротином и аппрет с метронидазолом, β -каротином и хлоргексидином был такой же активный, как и препарат Клион. Изучение активности лекарственных форм с метронидазолом и каротином *in vitro* показало, что они являются активным средством с широким спектром антимикробного действия, имеющим преимущества перед зарегистрированными препаратами метронидазола. Бактероиды и пептококки были более чувствительны к комбинированным лекформам, чем к монопрепарату метронидазола.

При моделированной инфекционной экспериментальной патологии кожи кроликов, инфицированных *S.aureus* 209P, установлена высокая фармакотерапевтическая эффективность олеогеля. Смена повязок выполнялась ежедневно до появления признаков развития в ране регенерационного процесса. При ежедневном нанесении олеогеля на рану отмечалось сокращение сроков полного закрытия раны при заражении кроликов госпитальными штаммами микроорганизмов на 3,6 дня.

Все компоненты, входящие в состав олеогеля и тканевых аппретов, являются официальными препаратами с хорошо изученными свойствами, в том числе и токсикологическими характеристиками. Однако, такая комбинация фармакологических веществ изучается впервые. Это обстоятельство позволяет предположить возможные от-

ношения фармакологического синергизма входящих ингредиентов в лекарственные формы. Для экспериментального обоснования безопасности использования олеогеля и тканевых аппретов, необходимо изучение острой токсичности и раздражающего действия. Острую токсичность олеогеля изучали при наружном применении на мышах, раздражающее действие определяли тестированием на хорион-аллантаиной оболочке куриных эмбрионов, на переднем сегменте глаза морских свинок (методом Драйза) и определяли раздражающее действие тканевых аппретов метронидазола с β -каротином и хлоргексидином на коже кроликов, используя скарификацию с оценкой кожной реакции в течение 72 часов.

Безопасность применения определяли интегрально по оценке раздражающего действия, острой токсичности и ЦНС-токсичности. Установлено, что при нанесении олеогеля на эпилированный участок спины мышей в течение первых суток и последующих 14 дней гибели животных не наблюдали, $LD_{50} > 5\text{ г/кг}$. Поведенческие и неврологические реакции мышей и крыс не выходили за пределы группы сравнения. Нетоксичность олеогеля и аппретов обеспечивает возможность длительного применения в комплексном лечении воспалительных процессов в коже.

Результаты, полученные экспериментально позволяют предложить олеогель и тканевые аппреты метронидазола с β -каротином в качестве вспомогательного лекарственного средства при раневой и комбустивной патологии кожи и воспалительных процессах в ней. При этом удачно сочетаются противовоспалительный эффект, антимикробное действие и стимуляция регенеративных процессов. Учитывая портативность, стабильность и технологичность таких лекарственных форм метронидазола, можно предположить комфортность и перспективность их применения. Полученные экспериментальные материалы позволяют предложить комплекс метронидазола с β -каротином микробиологическим в качестве противовоспалительного и ранозаживляющего средства с учетом приоритетности использования изученных нами лекарственных форм – олеогеля и тканевых аппретов.

ВЫВОДЫ

1. На основании системного анализа и выбора адекватных биомоделей экспериментально доказана противовоспалительная эффективность олеогеля метронидазола с β -каротином в статике и динамике, наблюдалась положительная динамика всех симптомов воспалительной реакции: снижение отека, гиперемии и нормализация температуры воспаленной конечности крыс. Действие олеогеля метронидазола с β -каротином обеспечило достоверное угнетение экссудативной фазы острого воспаления на 30,34% ($p < 0,05$), по сравнению с нелечеными животными. Противовоспалительная эффективность олеогеля составила 58,33%. При субхроническом воспалении олегель степень экссудации понижал на 21,2% ($p < 0,05$), а интенсивность пролиферативного процесса уменьшал на 24,7% ($p < 0,05$) по сравнению с животными, не получавшими лекарственную форму. Результаты не отличались достоверно от показателей группы сравнения (мазь индометациновая). Радиобиологически установлена кинетика метронидазола и его фиксация в очаге воспаления.
2. Олегель и тканевые аппреты метронидазола и β -каротина обладают регенеративным и ранозаживляющим эффектом при экспериментальной патологии кожи крыс и кроликов: ожог, линейная и инфицированная рана. При нанесении олеогеля с метронидазолом и β -каротином прочность рубца линейной кожной раны увеличилась на 34,24% ($p < 0,05$), что в 1,19 раза превосходило тензиометрическую характеристику рубца в случае применения ранозаживляющего препарата сравнения, содержащего растительные каротиноиды - облепиховое масло. Применение олеогеля уменьшило площадь ожогового повреждения: на 2-е сутки на 53,6% ($p < 0,05$), на 8-е сутки на 64,0% ($p < 0,01$) по сравнению с контролем. Тканевые аппреты с метронидазолом, β -каротином и хлоргексидином уменьшили общую площадь ожогового повреждения на 2-е сутки на 40,52% ($p < 0,05$), на 8-е сутки на 62,75% ($p < 0,05$), по сравнению с контролем, что составило 37,25% от контроля и этот эффект превосходит действие ранозаживляю-

шего препарата мази метилурациловой в ранние и более поздние сроки.

3. Антибактериальная активность олеогеля и аппретов установлена в отношении лабораторных и госпитальных штаммов микроорганизмов. Зоны задержки роста облигатных анаэробов при применении олеогеля составляли 32-55 мм, в зависимости от вида бактерий, и в некоторых случаях превышали зоны, образующиеся при использовании зарубежного монопрепарата (25-40 мм). Отмечалось сокращение сроков полного закрытия раны при заражении кроликов госпитальными штаммами микроорганизмов на 3,6 дня. Экспериментально проведен выбор оптимального тканевого носителя для тканевых аппретов: лигниновое полотно.
4. Согласно табуляции классов токсичности исследуемый олеогель метронидазола с β -каротином является практически нетоксичным лекарственным средством и безопасен при наружном применении $LD_{50} > 5000$ мг/кг. На кожу и слизистые оболочки оказывает слабое раздражающее действие, что установлено по степени раздражения хорион-аллантоисной оболочки куриных эмбрионов (2,33 балла), слизистой оболочки глаза морских свинок (3,67 балла) и кожи кроликов (2,9 балла для геля и 2,8 балла для аппрета) Поведенческие реакции экспериментальных животных не выходили за пределы животных группы сравнения.
5. Эффект олеогеля, содержащего метронидазол и микробиологический β -каротин и эффект тканевых аппретов, содержащих метронидазол, хлоргексидин и β -каротин по степени влияния на воспаление, заживление раны и антибактериальной активности не уступали действию официальных средств - мази индометациновой 10%, мази метилурациловой 10%, облепиховому маслу, импортной мази с метронидазолом. Олеогель и тканевые аппреты можно отнести к группе комбинированных лекарственных средств, сочетающих антибактериальную активность, противовоспалительную эффективность и стимуляцию регенерацию кожи.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

1. Гусоева, О.В. Методы фармакоэкономического анализа использования метронидазола в дерматологии / О.В. Гусоева // Экология и здоровье: сб. науч. тр. - Ессентуки: Ассоц. мед. центров ЮНЕСКО, 2007. – Вып. 11. – С. 151-158.
2. Гусоева, О.В. Экспериментальное изучение геля и аппретов метронидазола на моделях гнойных ран кроликов Влияние глюкозаминилмурамилдипептида на некоторые биохимические показатели крыс при экспериментальной патологии / О.В. Гусоева, А.В. Сергиенко, В.Н. Каркищенко // Экология и здоровье: сб. науч. тр. - Ессентуки: Ассоц. мед. центров ЮНЕСКО, 2008. – Вып. 12. – С. 204-211.
3. Сергиенко, А.В. Фармакоэкономический анализ применения метронидазола в дерматологической практике методом «анализ-эффективность» / А.В. Сергиенко, О.В. Гусоева // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. / Пятигорск. ГФА. - Пятигорск, 2008. – Вып. 63. – С.564-565.
4. Гусоева, О.В. Сравнительная фармакоэкономическая оценка применения метронидазола при кожных инфекциях / О.В. Гусоева, А.В. Сергиенко // Человек и лекарство: тез. докл. 15 Рос. нац. конгр. (14-18 апр. 2008г.).- М., 2008.-С.616.
5. Гусоева, О.В. Фармакологическая эффективность метронидазола при воспалении кожи крыс инфекционной и неинфекционной этиологии / О.В. Гусоева, А.В. Сергиенко // Междунар. конгр. по реабилитации в медицине и иммунореабилитации (13; 26-29 апр. 2008; Дубай, ОАЭ). Всемирный форум по астме. (26-29 апр.2008; Дубай, ОАЭ) // Аллергология и иммунология. - 2008.-Т.9.-№1. - С. 153.
6. Сергиенко, А.В. Перспектива метронидазола как вектора для терапии неспецифического воспаления в дерматологии / А.В. Сергиенко, О.В. Гусоева, В.Б. Сергиенко // Междунар. конф. «Физиология и патология иммунной системы», Междунар. конф. по иммунотерапии (4; 15-17 сент. 2008; Москва) // Аллергология и иммунология.– 2008. -Т. 9, №3. - С. 293.
7. Гусоева, О.В. Фармакологическое обоснование использование метронидазола при экспериментальной патологии кожи неинфекционной и инфекционной этиологии / О.В. Гусоева, А.В.Сергиенко, Н.Н.Каркищенко // Научно-практич.конф.с международным участием «Достижения клинической фармакологии в России» (07-08 сент. 2009; Москва) // – Клиническая фармакология и терапия. – 2009. - №6. – С. 270-271.

Гусосва Олеся Валерьевна

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
ПРИМЕНЕНИЯ НАРУЖНЫХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ МЕТРОНИДАЗОЛА
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ВОСПАЛЕНИИ**

**14.00.25 – ФАРМАКОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ
ФАРМАКОЛОГИЯ**

Подписано в печать 20.10.2009 г. Формат 60 x 84/16.

Бумага книжно-журнальная. Печать ротапринтная.

Усл. печ. л. 1,0. Уч.-изд. л. 1,0.

Тираж 100 экз. Заказ №.