



003462836

На правах рукописи

Ваша

Заикин Александр Вячеславович

**АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ
МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ИХ ВЛИЯНИЕ
НА ТЕЧЕНИЕ ИНФЕКЦИОННОГО РАНЕВОГО ПРОЦЕССА
В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

03.00.07 – микробиология

16.00.02 – патология, онкология и морфология животных

АВТОРЕФЕРАТ

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

05 MAR 2009

Ставрополь – 2009

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Курский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию».

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор Лазурина Людмила Петровна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор Тюменцева Ирина Степановна

кандидат биологических наук Тембай Татьяна Владимировна

Ведущая организация:

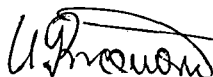
ФГОУ ВПО «Кубанский государственный аграрный университет».

Защита диссертации состоится «07» апреля 2009 г. в 14:30 часов на заседании диссертационного совета ДМ 212.256.09 в Ставропольском государственном университете по адресу: 355009, г. Ставрополь, ул. Пушкина, 1, корп. 2, комн. 506.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ставропольского государственного университета.

Автореферат разослан «18» февраля 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Ржепаковский И.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Проблема лечения гнойных ран и раневой инфекции издавна является одной из важнейших в медицине, занимая ведущее место в хирургической заболеваемости (от 35 до 40%) (Блатун Л.А., 2002; Страчунский А.С., Белоусова Ю.Б., Козлова С.Н., 2007). Обусловлено это изменившимся характером патогенных микроорганизмов, сложностью в выборе лечебной тактики, отсутствием унифицированных антибактериальных средств и методов лечения (Царев В.Н., Ушаков Р.В., 2004; Зузова А.П., Сивая О.В., 2008). Представление о раневом процессе постоянно меняется вместе с развитием медицины, микробиологии и технических наук и постоянно находится в центре пристального внимания клиницистов, приобретая медико-социальное значение (Кузин М.И., Костюченко Б.М., 1990; Чадаев А.Д., 2001; Никитюк Н.Ф., 2002; Быков В.И., 2008).

Постоянное внимание к этой сложной и актуальной проблеме объясняется также увеличением числа гнойно-воспалительных заболеваний, тяжестью их течения, прогрессирующим возрастанием антибиотикоустойчивых и антибиотикозависимых микроорганизмов (Беляева Е.В., 2002; Лазарева А.В., 2008). По данным ВОЗ, к 2010 году патология микробной этиологии снова станет главной причиной смертности людей во всех странах. В значительной степени такой неблагоприятный прогноз связан с ускорением формирования и распространения микробов, устойчивых к существующим препаратам. Одной из главных причин образования подобных штаммов бактерий является нерациональное использование антимикробных препаратов, обусловленное недостаточными знаниями особенностей существования бактерий, характера раневого микробиоценоза (Воробьев А.А., Быков А.С., Пашков Е.П., 1998). Поэтому одной из важных задач остается поиск новых методов и средств местного лечения, обладающих разнонаправленным действием, обеспечивающих антимикробный, иммуномодулирующий, противовоспалительный и репаративный эффект (Чадаев А.П., 2001).

В связи с этим оправданно повысился интерес к химической модификации лекарственных средств, которая может осуществляться различными способами, в том числе комплексообразованием с металлами, так как в организме жизненно важные металлы находятся преимущественно в виде координационных соединений. Для большинства металлов показано разнообразное действие на активность биологических процессов в организме человека, в то же время,

сравнительно мало известно о результатах их контакта с бактериями, патогенными для человека. Еще меньше данных о возможных результатах действия комплексных соединений металлов с лекарственными препаратами на бактерии. Однако именно изучение особенности действия новых комплексных соединений металлов на бактерии, находящиеся в раневом отделяемом, в присутствии различных факторов внешней среды может позволить сделать новый шаг к рациональной антимикробной терапии.

Поэтому комплексообразование биометаллов с уже известными лекарственными средствами может являться одним из эффективных и актуальных направлений поиска новых биологически активных соединений, так как оно позволит сочетать в одном веществе различные виды активности, которые к тому же могут взаимно усиливать друг друга, расширять спектр действия, снижать токсичность лекарственных средств.

В качестве металлов-комплексообразователей нами были выбраны цинк и железо, учитывая их положительную биологическую роль в жизнедеятельности организма. Необходимо отметить многообразную роль этих металлов в окислительно-восстановительных процессах, протекающих в организме, а также иммунологических реакциях, необходимых для процессов роста и кроветворения.

В качестве лиганд для комплексообразования с металлами были выбраны биологически активные вещества производные адамантана, нитроимидазола и нитрофурана. Из производных адамантана нас заинтересовало новое соединение, синтезированное в Пермском медицинском институте – N-(1-Адамантил)-2-гидрокси-4-оксо-4-(n-толил)-кротонамид, а производные нитроимидазола и нитрофурана часто используются в практической медицине.

Целью работы явилось изучение антимикробной активности новых комплексных соединений цинка и железа с производными адамантана, нитроимидазола, нитрофурана и разработанных на их основе поликомпонентных глицерогелей, а также их влияния на течение экспериментального раневого процесса.

Поставленная цель достигалась решением следующих задач:

1. Изучение биологической активности новых комплексных соединений цинка и железа с производными адамантана, нитроимидазола и нитрофурана, а также оценка возможности их использования в составе антимикробных лекарственных форм.

2. Проведение сравнительного анализа выживаемости различных бактерий в присутствии комплексных соединений металлов.

3. Исследование влияния новых биокомплексов на течение экспериментальной стафилококковой инфекции.

4. Разработка состава и технологии получения антимикробной полимерной лекарственной формы, содержащей новые биокомплексы и предназначенной для подавления гноеродной микрофлоры.

5. Изучение антимикробной активности разработанной поликомпонентной полимерной лекарственной формы и эффективности ее применения при экспериментальном воспалении.

6. Изучение реактивных изменений в органах и тканях при введении биокомплексов цинка и железа при моделировании экспериментального воспаления.

Научная новизна работы. Впервые установлены антимикробные, антигрибковые, иммуномодулирующие свойства разработанных комплексных соединений цинка и железа с производными адамантана, нитроимидазола и нитрофурана.

Оценено действие комплексных соединений металлов на выживаемость бактерии.

Показана высокая эффективность металлокомплексных соединений при лечении стафилококковой инфекции в эксперименте.

Результаты применения разработанных полимерных гидрогелей, содержащих биокомплексы цинка и железа, являются научно-экспериментальным обоснованием их использования в практическом здравоохранении при лечении гнойно-воспалительных инфекций кожи.

Практическая значимость работы. Установленная антимикробная, антимикотическая и иммуномодулирующая активность новых биокомплексов позволяет рекомендовать эти соединения для дальнейшего изучения в качестве препаратов выбора при лечении инфекций, вызванных различными видами облигатно- и факультативноанаэробных микроорганизмов.

Результаты проведенных исследований позволяют по-новому оценить выживаемость бактерий в естественных условиях раневого процесса в присутствии комплексного соединения.

Предложенные составы многокомпонентных глицерогелей обеспечивают выраженный антимикробный, обезболивающий, ранозаживляющий и регене-

прирующий эффекты при лечении и профилактике гнойно-воспалительных процессов кожи.

Материалы диссертации используются в научно-исследовательской работе и учебном процессе на кафедрах биологической и химической технологии, микробиологии и кафедре оперативной хирургии Курского государственного медицинского университета, на кафедре биомедицинской инженерии Курского государственного технического университета.

Основные положения, выносимые на защиту. Полученные результаты экспериментов *in vitro* и *in vivo* демонстрируют повышение антимикробной и антимикотической активности, иммуномодулирующие свойства новых биокомплексов цинка и железа с производными адамантана, нитроимидазола и нитрофурана относительно исходных лигандов.

Разработанные составы многокомпонентных полимерных гелей, обеспечивая воздействие на различные стороны патогенеза раневого процесса, позволяют сократить сроки лечения кожных гнойных воспалений в эксперименте в среднем в 1,5 раза.

Апробация работы. Основные положения работы представлены на научных конференциях Курского государственного медицинского университета (2006, 2007 гг.), межвузовских конференциях студентов и молодых ученых Курского государственного медицинского университета (2006, 2007 гг.), Всероссийской конференции «Гомеостаз и инфекционный процесс» (Москва, 2006 г.), Международной конференции «Современные медицинские технологии (диагностика, терапия, реабилитация и профилактика)» (Хорватия, 2006 г.), межкафедральной конференции Курского государственного университета (2008 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 работ, в том числе две из них в периодическом издании из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, 3-х глав собственных исследований, заключения, выводов и списка использованной литературы. Она изложена на 150 страницах компьютерного текста, содержит 44 таблицы и 9 рисунков. Библиографический указатель включает 146 отечественных и 50 зарубежных литературных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Для решения поставленных задач применен комплекс современных микробиологических, иммунологических, физико-химических, гистологических и математических методов. В качестве объектов исследования использованы образцы цельной крови, некоторые органы и биологические ткани экспериментальных животных. Объем исследования биологической активности синтезированных биоконплексов составил 216 проб биологических объектов (кровь, ткани и органы животных), 229 объектов для гистологического и 538 проб для микробиологического исследования синтезированных комплексов и гелей, т.е. всего 983 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 активных лигандов были выбраны следующие лекарственные вещества: производное адамантана – N-(1-Адамантил)-2-гидрокси-4-оксо-4-(p-толил)-кротонамид; производное пирроимидазола – мстронниазол (1-(в-окситил)-2-метил-5-нитроимидазол); производное нитрофурана – фурацилин (5-нитрофурурола семикарбазон), которые в последние годы часто применяется для лечения и профилактики различных инфекционных осложнений. В качестве металлов-комплексообразователей для синтеза были выбраны цинк и железо.

Определение антимикробной активности в отношении облигатных 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). Спорообразующий штамм – *Clostridium perfringens* 271, неспорообразующие бактерии – *Bacteroides fragilis* 323, *Bacteroides melanogenicus* 1011, *Fusobacterium necrophorum* VPJ 2523, *Peptococcus magnus* 336, *Peptostreptococcus* НС.

Антибактериальную активность лиганд, их комплексных соединений с биометаллами и гелей, приготовленных на их основе, в отношении факультативно-анаэробных микроорганизмов определяли *in vitro* методом диффузии в агар (Государственная фармакопсия XI, 1990 г.). 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, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* NCTC 2625.

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

Определение токсичности биокомплексов проводили на мышах при внутрибрюшинном способе введения (Беленький М.А., 1963; Arzamastsev E.V., 1988).

Местноанестезирующую активность разрабатываемых гелей изучали в опытах *in vivo* методом Ренье-Валета, в основе которого лежит изменение чувствительности роговицы глаза кролика при нанесении на нее исследуемого образца, выражающееся в ответной реакции на раздражитель в виде смыкания века (Игнатов Ю.Д., Васильев Ю.Н., Жуков В.Н., 1990).

Высвобождение лекарственных веществ из полимерных основ проводили методом диализа (Государственная фармаколея XI, 1990 г.).

Для изучения действия новых биокомплексов на гуморальный иммунный ответ крысам-самцам линии Вистар внутримышечно вводили исследуемые препараты в твине и физиологическом растворе в течение 5 дней с последующей иммунизацией животных эритроцитами барана и определением уровня развития гуморального иммунного ответа путем определения в селезенке количества антителообразующих клеток (Мальберг К., Зигль Э., 1987).

Изучение влияния биокомплексов на показатели врожденного иммунитета проведено на крысах-самцах линии Вистар массой 100-120 г. Препараты вводили внутримышечно 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 (БАС). Фагоцитарную реакцию оценивали в отношении *S. aureus* 209-P с определением процента активных фагоцитов (фагоцитарный индекс) и числа поглощенных частиц в пересчете на 1 фагоцитирующую клетку (фагоцитарное число). Завершенность фагоцитоза определяли как процент микробных клеток, подвергшихся разрушению фагоцитами при двухчасовом инкубировании. Состояние кислородзависимых бактерицидных систем фагоцитов оценивали *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 продигнозан-стимулированной реакциях при учете внутриклеточных отложений диформаза. В работе использовали НСТ-тест фирмы «Lachema» (Чехия). Резервную функцию системы фагоцитоза оценивали как разницу между показателями стимулированного и спонтанного теста (Виксман М.Е., Маянский А.Н., 1979). Уровень лизоцима определяли нефелометрическим методом (Дорофейчук В.Г., 1968).

Для изучения терапевтической эффективности полимерных лекарственных средств, содержащих новые биокомплексы, на крысах-самцах линии Вистар моделировали инфицированную гнойную рану. Под наркозом в асептических условиях наносили рану по паравертебральной линии 2×2 см², которую инфицировали 0,2 мл взвеси суточной агаровой культуры *S. aureus* № 554, 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, проводили лечение раны гелями. Морфологические исследования тканей раны, изучение обсемененности производили после декапитации животных на 3, 5, 7, 9, 14 и 21 сутки. Динамику репаративных процессов в ране оценивали с учетом наличия и характера воспалительной реакции, состояния краев и дна раны, сроков очищения раны от некротических тканей и появления грануляций, сроков эпителизации раны. Скорость заживления раны определяли в динамике заживления путем измерения площади раны. Гистоструктурные изменения в раневых био-

птатах изучали при исследовании препаратов, окрашенных гематоксилин-эозином.

Результаты исследований и их обсуждение

Проблема поиска и разработки лекарственных средств продолжает оставаться одной из актуальных проблем здравоохранения. Анализ многочисленных исследований, выполненных в разных странах, показывает, что клиническая эффективность антибиотиков достигла предела, а возможность открытия новых препаратов практически исчерпана. Поэтому модификация широко используемых антимикробных препаратов становится одним из актуальных вопросов современной медицины, так как распространение гнойно-воспалительных заболеваний с годами не уменьшается, а тяжесть их течения может приводить к летальным исходам.

В связи с этим оправданно повысился интерес к наиболее рациональному использованию уже известных лекарственных средств, в частности, к созданию комплексных соединений с жизненно важными металлами, так как рядом исследователей показано, что такие соединения могут обладать не только большей биологической активностью по сравнению с исходными лигандами, но иметь и более широкий спектр действия.

Для этих целей нами был синтезирован ряд комплексных соединений цинка и железа с производными нитроимидазола (1-(*ν*-оксиэтил)-2-метил-5-нитроимидазол) (MN), адамантана (N-(1-адамантил)-2-гидрокси-4-оксо-4-(*p*-толил)-кротонамид) (HAd) и нитрофурана (5-нитрофурфурол семикарбазон) (NFS) и изучена их биологическая активность, что может служить теоретической предпосылкой для целенаправленного синтеза комплексных соединений с заданными свойствами.

С помощью Интернет-системы прогноза на основе компьютерной программы PASS нами была исследована биологическая активность новых химических комплексных соединений цинка с производными адамантана и нитроимидазола. Компьютерная программа PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) прогнозирует 900 видов биологической активности по структурной формуле химического вещества, включая основные и побочные фармакологические эффекты и механизмы действия. В нашем исследовании установлено, что при введении металла (цинка) в структуру лекарственного средства, например, производного нитроимидазола, прогнозируется значительное увеличение антибактериальной активности по сравнению с лигандом, а также увеличе-

ние противовоспалительной, дерматологической, противоаллергической и противоязвенной активности. Кроме того, прогнозируется появление новых активностей: антимикотической, анальгезирующей, противовирусной и др.

В результате проведенных сравнительных исследований по изучению антимикробной активности лиганд и их комплексных соединений цинка и железа в отношении факультативно-анаэробных микроорганизмов было установлено, что изучаемые биоконплексы обладают антимикробной активностью в отношении изученных факультативно-анаэробных микроорганизмов, но в разной степени (таблица 1). Наиболее выраженное антимикробное действие было обнаружено у изучаемых биоконплексов цинка и железа с производными адамантана, нитроимидазола и нитрофурана в отношении всех исследованных тест-микробов по сравнению с чистыми лигандами, так как зона задержки роста в отношении исследованных микроорганизмов значительно увеличивалась.

Таблица 1

Антимикробная активность лигандов и их комплексных соединений цинка и железа в отношении факультативно-анаэробных микроорганизмов

Тест-культура	Диаметр зоны задержки роста бактерий в мм (M±m)						
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> 209-P	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>B. cereus</i> ATCC 10702	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC	<i>C. albicans</i> NCTC
HAd	8,9±0,3	8,2±0,3	8,9±0,3	7,0±0,2	7,6±0,2	6,4±0,2	6,0±0,2
HAdZn	18,7±0,4	16,5±0,3	18,4±0,4	16,2±0,3	16,4±0,3	15,8±0,2	15,0±0,2
HAdFe	17,2±0,3	15,0±0,3	17,0±0,4	15,0±0,3	15,0±0,3	14,4±0,2	14,2±0,2
MN	9,2±0,2	8,2±0,2	9,8±0,2	6,8±0,3	8,2±0,3	7,0±0,2	8,0±0,2
MNZn	19,5±0,4	17,2±0,3	19,0±0,4	16,8±0,4	17,2±0,3	16,3±0,4	16,0±0,2
MNFe	18,0±0,4	16,0±0,3	18,2±0,4	15,4±0,3	16,7±0,3	15,4±0,3	15,0±0,2
NFS	10,3±0,2	8,4±0,2	10,0±0,2	7,4±0,3	7,0±0,3	7,7±0,2	8,0±0,2
NFSZn	20,0±0,4	18,9±0,3	19,0±0,4	18,4±0,4	19,7±0,3	18,1±0,4	19,5±0,2
NFSFe	18,0±0,2	16,2±0,2	17,1±0,2	17,1±0,3	16,9±0,3	15,0±0,2	15,5±0,2

Примечание: HAd – производное адамантана; HAdZn – комплекс цинка с производным адамантана; HAdFe – комплекс железа с производным адамантана; различия данных по отношению к производному адамантана достоверно (P<0,05); MN – производное нитроимидазола (метронидазол); MNZn – комплекс цинка с метронидазолом; MNFe – комплекс железа с метронидазолом; различия данных по отношению к метронидазолу достоверно (P<0,05); NFS – производное нитрофурана (фурацилин); NFSZn – комплекс цинка с фурацилином; NFSFe – комплекс железа с фурацилином; различия данных по отношению к фурацилину достоверно (P<0,05).

Биокомплекс цинка с производным адамантана проявлял наиболее выраженное антимикробное действие в отношении *S. aureus* и *B. subtilis*, т.к. зона задержки роста микроорганизмов составляла $18,7 \pm 0,4$ мм и $18,4 \pm 0,4$ мм соответственно. Изучаемые биокомплексы цинка с метронидазолом и фурацилином в отношении *S. aureus* и *B. subtilis* также проявили наиболее значимую антимикробную активность как в отношении лиганд, то есть метронидазола и фурацилина, так и в отношении биокомплекса цинка с производным адамантана. Зоны задержки роста тест-штаммов в отношении *S. aureus* и *B. cereus* соответственно составили для метронидазола и для фурацилина $19,5 \pm 0,4 - 19,0 \pm 0,4$ мм и $20,0 \pm 0,4 - 19,0 \pm 0,4$ мм.

В случае использования комплексов железа с метронидазолом, производным адамантана и производным нитрофурана антимикробная активность также была значимо выше во всех случаях по сравнению с лигандами.

Таким образом, установлено, что комплексные соединения цинка и железа с производным адамантана, метронидазолом и фурацилином в отношении всех изученных тест-микробов проявляли более высокую по сравнению с лигандами антимикробную активность, т.к. зона задержки роста в отношении исследованных микроорганизмов значимо увеличивалась.

С целью установления более полной характеристики антимикробного действия изучаемых биокомплексов в отношении указанных тест-штаммов факультативно-анаэробных бактерий определены их минимальные подавляющие концентрации (таблица 2).

Установлено, что производные адамантана и нитроимидазола оказывали подавляющее действие в отношении изученных тест-микробов в концентрации $2,5$ мг/мл – $5,0$ мг/мл, а производное нитрофурана – в дозе $1,25 - 2,5$ мг/мл. Комплексные соединения цинка с производными адамантана, нитроимидазола и нитрофурана оказывали подавляющее действие в концентрации $0,63 - 2,5$ мг/мл. Минимальная подавляющая концентрация комплексных соединений железа с изучаемыми лигандами была в дозе $0,31 - 2,5$ мг/мл.

Таким образом, комплексообразование цинка и железа с производными адамантана, нитроимидазола и нитрофурана способствовало повышению их антимикробной активности в отношении изученных микроорганизмов *in vitro*, что позволило рекомендовать данные комплексные соединения для дальнейшего изучения в качестве антимикробных лекарственных средств.

Таблица 2

**Минимальные подавляющие концентрации производных
адамантиана, нитроимидазола и нитрофурана и их комплексных
соединений цинка и железа**

Тест-культура	Минимальная подавляющая концентрация препарата, мг/мл								
	HA d	HA dZn	HA dFe	MN	MN Zn	MN Fe	NFS	NFS Zn	NFS Fe
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2,50	1,25	1,25	2,50	0,63	0,31	1,25	0,63	0,31
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P	2,50	1,25	1,25	2,50	0,63	0,31	1,25	0,63	0,31
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	5,00	2,50	2,50	2,50	1,25	1,25	2,50	0,63	0,63
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10702	5,00	2,50	2,50	2,50	1,25	1,25	2,50	0,63	0,63
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2,50	1,25	1,25	2,50	1,25	1,25	2,50	1,25	1,25
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	5,00	2,50	2,50	5,00	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	5,00	2,50	2,50	5,00	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
<i>Candida albicans</i> NCTC 2625	5,00	2,50	2,50	2,50	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25

Примечание: HAd – производное адамантиана; HAdZn – комплекс цинка с производным адамантиана; HAdFe – комплекс железа с производным адамантиана; MN – производное нитроимидазола; MNZn – комплекс цинка с производным нитроимидазола; MNFe – комплекс железа с производным нитроимидазола; NFS – производное нитрофурана; NFSZn – комплекс цинка с производным нитрофурана; NFSFe – комплекс железа с производным нитрофурана.

В ряде работ показано, что антимикробное действие препарата, установленное *in vitro*, не всегда совпадает с его активностью в живом организме. Поэтому представляло интерес проведение исследований на лабораторных животных по изучению антимикробного действия лигандов и их комплексных соединений *in vivo*. Так как все исследованные бикомплексы обладали выраженной активностью в отношении стафилококков, то нами были проведены исследования протективной активности комплексов цинка и железа в опытах на мышцах при внутрибрюшинном их заражении культурой *S. aureus* № 554. Кроме того, 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.

Изучение влияния новых комплексных соединений на течение стафилококковой инфекции в эксперименте на мышцах показало увеличение терапевти-

ческой активности по сравнению с исходными лигандами, так как выживаемость животных, леченых биоконplexами, составила 80 – 99%.

Исследование антигрибковой активности новых комплексных соединений цинка и железа позволило охарактеризовать их как биологически активные вещества с умеренной антимикотической активностью.

Одной из главных причин, осложняющей ситуацию в современной хирургии, является отмечаемое в последние годы неблагоприятное изменение иммунобиологической реактивности организма. Поскольку лекарственные препараты обладают побочным действием на организм и, в частности, могут оказывать отрицательное влияние на различные звенья иммунной системы, нами было изучено влияние новых биоконplexов на показатели иммунного ответа. Показано, что изучаемые лиганды не оказывали существенного влияния на формирование гуморального иммунного ответа, индуцированного эритроцитами барана, а введение биоконplexов цинка и железа повышало иммуномодулирующее действие, так как количество антителообразующих клеток возрастало в 1,5 – 2 раза.

Одним из факторов антиинфекционной защиты, определяющим дальнейшее развитие инфекционного процесса, является ее неспецифическое звено. Результаты изучения влияния биоконplexов цинка и железа на фагоцитарную активность лейкоцитов позволили выявить более высокие значения показателей фагоцитоза в группах животных, которым вводили биоконplexы цинка и железа, так как фагоцитарный индекс значительно превышал показатели как контрольной группы, которым вводили физиологический раствор натрия хлорида, так и групп, которым вводили лиганды (производные адамантана, нитроимидазола и нитрофурана). Активность кислородзависимых бактерицидных систем нейтрофилов в тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) также свидетельствует о стимулирующем влиянии исследованных биоконplexов. Использование биоконplexов оказывало выраженный стимулирующий эффект на кислороднезависимые бактерицидные системы нейтрофилов, определяемые в тесте на лизосомальные катионные белки. Стимуляция бактерицидных систем нейтрофилов послужила, по нашему мнению, причиной усиления завершенности фагоцитоза под действием биоконplexов.

Установлено, что как лиганды, так и синтезированные на их основе биоконplexы относятся к классу малотоксичных веществ и не обладают раздражающим и алергизирующим действием на кожу морских свинок в 0,5 - 1,0%-

ных концентрациях, не оказывают отрицательного воздействия на морфологическую структуру кожи и печени.

Результаты проведенных исследований позволили нам сделать вывод о целесообразности проведения дальнейших исследований по изучению возможности применения новых биоконплексов в полимерных лекарственных формах с целью их использования для лечения инфицированных ран. Поиск в области разработки новых аппликационных лекарственных форм и составов для лечения воспалительных заболеваний актуален, а использование для этих целей гидрофильных основ может обеспечить создание необходимой и удобной, в каждом конкретном случае, консистенции, хорошо фиксирующейся на поверхности, что будет способствовать локализации препарата на определенном участке. Большой интерес для разработки иммобилизованных лекарственных форм для лечения ран представляют производные целлюлозы, так как они имеют ряд преимуществ: лекарственные вещества хорошо и равномерно распределяются в их растворах; не обладают аллергизирующими свойствами; более устойчивы к действию микроорганизмов; способствуют лучшему контактированию лекарственных веществ с пораженным участком и т.д. Мягкие лекарственные формы готовили на основах гидрофильной природы: 5% глицерогели метилцеллюлозы (МЦ), натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) и оксиметилцеллюлозы (ОМЦ). Антимикробную активность мягких лекарственных форм исследовали в опытах *in vitro* методом диффузии в агар. Установлено, что использование гидрофильных основ в виде 5% глицерогелей не препятствует проявлению антимикробной активности как лиганд, так и их биоконплексов в отношении изученных тест-микроорганизмов. Диаметр зоны задержки роста тест-микробов для глицерогелей, содержащих (0,5-1,0%) биоконплексы цинка и железа, значительно превышал зону угнетения тест-штаммов в случае использования полимерных гелей, содержащих исходные лиганды.

Показано, что изучаемые основы не препятствовали высвобождению активных компонентов, о чем свидетельствовало постоянное нарастание концентрации до $89,5 \pm 0,68\%$ изучаемых веществ к 4-5 часам эксперимента и до $90 \pm 0,95\%$ к 5-6 часам эксперимента.

Предпосылкой более эффективного медикаментозного лечения ран является применение лекарственных препаратов многонаправленного действия за счет использования многокомпонентной лекарственной формы.

При разработке состава антимикробной полимерной лекарственной формы нами было изучено влияние анестетика, антисептика и других вспомогательных веществ на подавление гноеродной микрофлоры. Установлено, что введение в состав глицерогелей тримекаина (3%) также не оказывало отрицательного действия на высвобождение активных компонентов и не снижало их антимикробную активность (таблица 3). Наибольшие показатели силы (индекс Ренье $1300 \pm 5,6$ усл. ед.) и продолжительности анестезии ($98,15 \pm 2,17$ мин) имели место при одновременном сочетании в гелях тримекаина, производного нитроимидазола и его биокомплекса с цинком, а время наступления анестезии было во всех случаях одинаково.

С целью повышения степени высвобождения из глицерогелей изучаемых активных компонентов была изучена возможность добавления активатора кожного всасывания – димексида, который к тому же обладает антимикробной и противовоспалительной активностью. Показано, что увеличение концентрации димексида до 15% способствует увеличению активных компонентов в диализате, что позволяет характеризовать изучаемые глицерогели как пролонгированные лекарственные формы.

Таблица 3

Антимикробная активность глицерогелей, содержащих тримекаин

Компоненты глицерогеля	Диаметры зоны задержки роста тест-штаммов, мм (M±m)			
	<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10702
Тримекаин, производное НАд, Na-КМЦ	15,4±0,3	13,7±0,2	14,2±0,3	14,8±0,2
Тримекаин, производное нитроимидазола, Na-КМЦ	16,8±0,3	13,9±0,3	14,7±0,7	15,0±0,3
Тримекаин, производное нитрофурана, Na-КМЦ	17,3±0,3	17,1±0,2	17,2±0,2	17,9±0,3

Другим активным компонентом разрабатываемых глицерогелей был выбран хлоргексидин, применяемый как антисептик для инфицированных ран и ожогов, а в качестве пластификатора – глицерин. Установлено, что антимикробная активность многокомпонентных глицерогелей (таблица 4) достоверно увеличивалась при включении в их состав хлоргексидина, димексида и триме-

каина по сравнению с контролем и глицерогелями, содержащими только лиганды.

Таблица 4

Антимикробная активность глицерогелей

№ гр.	Состав гелей		Диаметр зоны задержки роста тест-штаммов, мм (M±m)				
	Основа	Активный компонент	<i>S.aureus</i> ATCC 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
1	На-КМЦ Глицерин Вода очищенная (контроль)	HAAd	12,5±0,3	12,7±0,2	12,9±0,3	12,8±0,3	11,4±0,2
		MN	15,2±0,2	13,5±0,2	13,9±0,3	13,9±0,2	12,9±0,3
		NFS	17,9±0,3	18,9±0,3	22,1±0,3	20,1±0,2	14,5±0,3
2	Хлоргексидин Тримекаин Димексид На-КМЦ Глицерин Вода очищенная	HAAd	16,5±0,3	15,0±0,3	15,0±0,3	15,3±0,2	13,5±0,3
		MN	17,1±0,4	14,7±0,3	16,2±0,3	16,5±0,2	14,1±0,3
		NFS	19,3±0,3	22,0±0,3	24,4±0,2	23,5±0,3	16,4±0,3
3	Хлоргексидин Тримекаин Димексид На-КМЦ Глицерин Вода очищенная	HAAdZn	28,5±0,4 ^{1,2}	30,3±0,2 ^{1,2}	29,2±0,3 ^{1,2}	29,0±0,2 ^{1,2}	23,4±0,2 ^{1,2}
		MNZn	30,6±0,3 ^{1,2}	32,0±0,2 ^{1,2}	33,1±0,3 ^{1,2}	30,2±0,2 ^{1,2}	24,5±0,2 ^{1,2}
		NFSZn	30,1±0,4 ^{1,2}	31,5±0,2 ^{1,2}	35,2±0,3 ^{1,2}	36,7±0,4 ^{1,2}	23,4±0,3 ^{1,2}
4	Хлоргексидин Тримекаин Димексид На-КМЦ Глицерин Вода очищенная	HAAdFe	26,4±0,3 ^{1,2}	27,5±0,3 ^{1,2}	26,4±0,2 ^{1,2}	26,9±0,3 ^{1,2}	21,8±0,2 ^{1,2}
		MNFe	28,4±0,3 ^{1,2}	30,0±0,3 ^{1,2}	30,1±0,4 ^{1,2}	28,2±0,3 ^{1,2}	22,4±0,3 ^{1,2}
		NFSFe	29,2±0,3 ^{1,2}	30,8±0,3 ^{1,2}	35,0±0,2 ^{1,2}	35,8±0,3 ^{1,2}	21,0±0,2 ^{1,2}

Примечание: HAAd – производное адамантана; HAAdZn – биоконплекс цинка с производным адамантаном; HAAdFe – биоконплекс железа с производным адамантана; MN – производное нитроимидазола; MNdZn – биоконплекс цинка с производным нитроимидазола; MNFe – биоконплекс железа с производным нитроимидазола; NFS – производное нитрофурана; NFSZn – биоконплекс цинка с производным нитрофурана; NFSFe – биоконплекс железа с производным нитрофурана; 1 - достоверность различий средних относительно 1-й группы; 2 - достоверность различий средних относительно 2-й группы (p<0,05).

Таким образом, в результате комплексного исследования разработаны составы и технология получения стабильных, в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи XI, глицерогелей (составы 1, 2, 3) для подавления гноеродной микрофлоры раневого процесса, способные обеспечить доста-

точную антимикробную активность и многонаправленное терапевтическое действие.

Состав 1, г: производное нитроимидазола (1,00) (или его комплексные соединения или цинка, или железа); хлоргексидин (0,25); димексид (1,00); тримекаин (3,00); Na-КМЦ (4,00); глицерин (10,00); вода очищенная (до 100).

Состав 2, г: производное адамантана (1,00) (или его комплексные соединения или цинка, или железа); хлоргексидин (0,25); димексид (1,00); тримекаин (3,00); Na-КМЦ (4,00); глицерин (10,00); вода очищенная (до 100).

Состав 3, г: производное нитрофурана (0,25) (или его комплексные соединения или цинка, или железа); хлоргексидин (0,25); димексид (1,00); тримекаин (3,00); Na-КМЦ (4,00); глицерин (10,00); вода очищенная (до 100).

В эксперименте на животных при инфицированном процессе (модель полнослойной гнойной раны) изучено ранозаживляющее действие глицерогелей, содержащих биоконплексы цинка и железа с метронидазолом. В качестве контроля на тех же основах готовили гели с производным нитроимидазола (метронидазол), а также в качестве сравнения использовали готовую мазь «Левомеколь», широко применяемую для лечения местной гнойной инфекции. Установлено, что использование в составе глицерогеля биоконплексов цинка и железа с метронидазолом быстро купировало воспалительный процесс, оказывало стимулирующее влияние на процессы восстановления поврежденной ткани, что проявлялось в активизации образования демаркационной линии очага воспаления, более быстрым развитием грануляционной соединительной ткани по сравнению с контролем, и позволило получить хороший эффект при лечении гнойных раневых процессов стафилококковой этиологии. Введение в состав глицерогелей дополнительно тримекаина, хлоргексидина, димексидина и глицерина усиливало их антимикробную активность и ранозаживляющее и регенерирующее действие, а также позволило сократить сроки лечения с 14 суток до 10-12 суток.

Новый методический прием повышения антимикробной активности лекарственных средств и коррекции баланса микроэлементов в организме, апробированный в эксперименте на животных, целесообразно использовать для разработки адекватных лечебно-профилактических мероприятий, направленных на мобилизацию резервных возможностей организма.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что новые комплексные соединения цинка и железа с производными адамантана, нитронмидазола и нитрофурана обладают более выраженным антимикробным действием в отношении тест-штаммов микроорганизмов по сравнению с исходными лигандами.

2. Действие новых комплексных соединений металлов на бактерии имеет индивидуальный характер и сопровождается усилением микробицидных свойств.

3. Показана высокая эффективность металлокомплексных соединений при лечении экспериментальной стафилококковой инфекции, заключающаяся в снижении смертности животных при их инфицировании в 1,3-1,6 раза.

4. Комплексообразование цинка и железа с производными адамантана, нитронмидазола и нитрофурана приводит к усилению стимулирующего действия на факторы неспецифической резистентности (фагоцитоз, лизоцим, бактерицидная активность сыворотки крови), гуморального и клеточного иммунитета. Установлена низкая токсичность и отсутствие раздражающего эффекта изучаемых биоконплексов.

5. Разработаны составы многокомпонентных полимерных гидрогелей, содержащих биоконплексы цинка и железа, и установлена их выраженная антимикробная активность, биологическая переносимость, противовоспалительный и обезболивающий эффекты, возможность обеспечения пролонгированного антимикробного действия, что в результате позволило сократить сроки лечения кожных гнойных воспалений в 1,5 раза.

6. Изучены реактивные изменения в тканях при введении новых биоконплексов цинка и железа и установлено их стимулирующее влияние на процессы восстановления поврежденных тканей, заключающиеся в активизации образования демаркационной линии очага воспаления и более быстром развитии грануляционной соединительной ткани по сравнению с контролем.

7. Результаты антимикробной активности полимерных гидрогелей на основе комплексных соединений дают основание рекомендовать их для проведения клинических испытаний с целью дальнейшего использования в качестве лекарственных препаратов выбора для подавления гнойеродной микрофлоры.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Заикин, А.В. Фотоколориметрическое определение Cu^{2+} и SCN^- – ионов / А.В. Заикин // Молодежная наука и современность. Юбилейная межвузовская научная конференция студентов и молодых ученых, посвященная 70-летию КГМУ. В 2-х частях. – Курск: КГМУ, 2005. – Ч. II. – С. 172.

2. Казюлькин, В.С. Изучение антимикробной активности комплексного соединения цинка (II) с производным 5-нитрофурана / В.С. Казюлькин, Д.А. Хапчаева, И.В. Самохвалова, А.В. Заикин // Университетская наука: Взгляд в будущее / Сборник трудов 71-й научной конференции КГМУ и сессии Центрально-Черноземного научного центра РАМН. В 2-х томах – Курск: КГМУ, 2006. – Т. 2. – С. 229-230.

3. Казюлькин, В.С. Изучение действия ультразвука на скорость высвобождения биоконплексов из гелей / В.С. Казюлькин, Д.А. Хапчаева, А.А. Краснов, Е.М. Букреева, А.В. Заикин, Ю.С. Семенова // Молодежная наука и современность. 71-я итоговая межвузовская конференция студентов и молодых ученых. В 2-х частях. – Курск: КГМУ, 2006. – Ч. II. – С. 159.

4. Самохвалова, И.В. Изучение возможности использования компьютерного прогноза спектра биологической активности ряда новых биоконплексов / И.В. Самохвалова, А.А. Краснов, Д.А. Хапчаева, Е.М. Букреева, А.В. Заикин // Молодежная наука и современность. 71-я итоговая межвузовская конференция студентов и молодых ученых. В 2-х частях. – Курск: КГМУ, 2006. – Ч. II. – С. 166-167.

5. Хапчаева, Д.А. Исследование биологической активности биоконплексов с производными 5-нитрофурана / Д.А. Хапчаева, А.Г. Сидорова, И.В. Самахвалова, Е.В. Букреева, А.В. Заикин // Молодежная наука и современность. 71-я итоговая межвузовская конференция студентов и молодых ученых. В 2-х частях. – Курск: КГМУ, 2006. – Ч. II. – С. 167-168.

6. Букреева, Е.М. Изучение биологической активности новых биоконплексов с производными нитроимидазола и нитрофурана / Е.М. Букреева,

А.В. Заикин, А.А. Краснов, Л.П. Лазурина и др. // Вестник новых медицинских технологий: Сб. трудов. – Тула, 2006. – № 2. – С. 142-144.

7. Лазурина, Л.П. Изучение антимикробной активности многокомпонентных гелей, содержащих новые биоконплексы металлов с производными нитрофурана / Л.П. Лазурина, И.В. Самохвалова, А.А. Краснов, Д.А. Хапчаева, С.В. Костров, Е.М. Букреева, А.В. Заикин // Современные наукоемкие технологии. – 2006. – № 5. – С. 66-67.

8. Самохвалова, И.В. Изучение ралозаживляющего и иммуномодулирующего действия некоторых новых биоконплексов металлов / И.В. Самохвалова, Д.А. Хапчаева, С.В. Костров, Е.М. Букреева, А.В. Заикин и др. // Современные проблемы науки и образования. – 2006. – № 5. – С. 97-98.

9. Букреева, Е.М. Создание новых лекарственных форм, содержащих комплексные соединения меди, серебра и цинка / Е.М. Букреева, А.В. Заикин, О.Н. Карпова, М.Т. Шехине и др. // Молодежная наука и современность. 72-я итоговая межвузовская конференция студентов и молодых ученых. В 2-х частях. – Курск: КГМУ, 2007. – Ч. II. – С. 101.

10. Букреева, Е.М. Изучение возможности разработки пролонгированной лекарственной формы, содержащей новые комплексные соединения антимикробного действия / Е.М. Букреева, А.В. Заикин, С.В. Костров, А.А. Колоколов и др. // Молодежная наука и современность. 72-я итоговая межвузовская конференция студентов и молодых ученых. В 2-х частях. – Курск: КГМУ, 2007. – Ч. II. – С. 102.

11. Краснов, А.А. Апробация компьютерной системы PASS на примере прогноза фармакологической активности веществ / А.А. Краснов, С.В. Костров, А.В. Заикин, О.С. Лосицкая и др. // Молодежная наука и современность. 72-я итоговая межвузовская конференция студентов и молодых ученых. В 2-х частях. – Курск: КГМУ, 2007. – Ч. II. – С. 131-132.

12. Басарева, О.И. Изучение биологической активности комплексных соединений металлов с некоторыми антимикробными средствами / О.И. Басарева, А.В. Заикин, Д.А. Хапчаева, С.В. Костров и др. // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2007. – № 4. – С. 5-11.

13. Заикин, А.В. К вопросу кожной проницаемости лекарственных средств / А.В. Заикин, О.С. Лосицкая, М.Т. Шехине, Е.М. Букреева // Университетская наука. Взгляд в будущее. Сб. трудов 72-й научной конференции КГМУ и сессии Центрально-Черноземного научного центра РАМН / Российский симпозиум «Закономерности интеграции физиологических функций в норме и их дезинтеграции в патологии». В 3-х томах. – Курск: КГМУ, 2007. – Т. III. – С. 158-159.

14. Патент № 2301989 РФ Способ количественного определения роданид ионов / М.В. Рымарова, А.В. Заикин, Л.П. Лазурина. – Заявка 2005140125/28 от 21.12.05; Опубликовано 27.06.2007; Бюл. № 18.

Лицензия ЛР № 020862 от 30.04.99 г.
Сдано в набор 29.01.2009 г. Подписано в печать 30.01.2009 г.
Формат 30x42¹/₈. Бумага офсетная. Гарнитура Times New Rom.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,0.
Тираж 100 экз. Заказ № 63А
Издательство Курского государственного медицинского университета
305041, г. Курск, ул. К. Маркса, 3.