

На правах рукописи

ЛОСИЦКАЯ Олеся Сергеевна

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ НАРУЖНЫХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ, СОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕКСНЫЕ
СОЕДИНЕНИЯ ЦИНКА С ПРОИЗВОДНЫМИ
ДИАМИНОПИРИМИДИНА И ХИНОКСАЛИНА ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ВОСПАЛЕНИИ**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Белгород – 2013

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

Научный руководитель **Лазурин Людмила Петровна**
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Шапошников Андрей Александрович**
доктор биологических наук, профессор, ФГАОУ
ВПО «Белгородский государственный
национальный исследовательский университет»,
Министерства образования и науки Российской
Федерации, заведующий кафедрой биохимии и
фармакологии.

Лебедев Александр Валерьевич
кандидат биологических наук, доцент, ФГБОУ
ВПО "Орловский государственный
университет» Министерства образования и
науки Российской Федерации, заведующий
кафедрой фармакологии, клинической
фармакологии и фармации

Ведущая организация Государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального
образования Первый Московский
государственный медицинский университет
им. И.М.Сеченова Минздрава России

Защита состоится « ___ » _____ 2013г. в _____ на заседании совета по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук Д 212.015.13 при ФГАОУ ВПО Белгородский государственный национальный исследовательский университет по адресу: 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет».

Автореферат разослан « _____ » _____ 201_ г.

Учёный секретарь
совета по защите диссертаций на соискание
учёной степени кандидата наук, на соискание
учёной степени доктора наук, д.б.н.

В.И. Кочкаров

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Вот уже несколько десятилетий лечение инфекционных процессов остается одной из актуальных проблем современной медицины в силу неуклонной тенденции к росту числа больных и стабильно высокой летальности (30-50%) в самых авторитетных клиниках (Козлов С. Н., 2009, Князев С.А., 2010). Такой рост заболеваемости гнойно-воспалительными процессами связан со многими факторами. Прежде всего, как ни парадоксально, это результат значительного прогресса в медицине. Увеличение продолжительности жизни населения и числа лиц с тяжелыми хроническими заболеваниями и осложнениями, пациенты длительно находящиеся на глюкокортикоидной или цитостатической терапии, увеличившееся количество обширных радикальных вмешательств привело к качественному изменению контингента больных (Савельев В. С., 2010). Инфекции у данной категории больных развиваются чаще и протекают тяжелее.

Спектр преобладающих возбудителей инфекции изменился за последние 20 лет, и в настоящее время гнойная инфекция в тканях вызывается грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами приблизительно в равной степени. Исчезновение доминирующей роли грамотрицательных микроорганизмов сопровождается изменениями этиологической структуры внутри этой группы. Возросла частота гнойной инфекции, вызываемой не ферментирующими грамотрицательными бактериями (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*), энтеробактериями, продуцентами β -лактамаз расширенного спектра. Другой аспект- это рост на 200% частоты встречаемости за последние годы гнойной инфекции, вызываемой грибковой инфекцией. Очевидно, что своевременная диагностика и выделение инфекционного агента могут считаться приоритетными для формирования благоприятного исхода как следствие адекватного контроля источника инфекции, рациональной антимикробной терапии и соответствующего иммунного ответа (Аджамов Б. М., 2010). Задержка с назначением адекватной антибактериальной терапии сопровождается значимым увеличением летальности. Так, при септическом шоке неадекватная (несвоевременная) эмпирическая антибактериальная терапия приводит к пятикратному увеличению летальности (А.Кumar et al., 2009).

В связи с этим работы в области поиска новых методов и лекарственных средств для местного лечения ран являются весьма актуальными. Неправомерность использования устаревших препаратов подтверждается несколькими факторами: они не обладают требуемой антимикробной активностью, не обеспечивают обезболивающего, осмотического и противоотечного эффекта. Поэтому повышение эффективности уже известных лекарственных средств представляет большой интерес.

Одним из путей повышения эффективности лекарственных средств, согласно литературным данным, может явиться комплексообразование лекарственных средств с жизненно важными металлами (цинк, медь, кобальт,

железо и т.д.), которые оказывают большое влияние на жизнедеятельность организма.

В связи с этим изучение влияния комплексных соединений на противомикробную активность лиганд представляет большой интерес и может позволить открыть новые возможности рациональной антимикробной терапии иммобилизованных наружных форм для лечения гнойных ран.

Настоящая работа выполнена в соответствии с одним из научных направлений Курского государственного медицинского университета и кафедры биологической и химической технологии по проблеме «Медико-биологические информационные технологии» (№ госрегистрации ВНИИ Центра 12009565143).

Целью работы – фармакологическое обоснование применения наружных иммобилизованных форм, содержащих комплексные соединения цинка с 5-[(3,4,5-Триметоксифенил) метил]-2,4-пиримидиндиамином и 2,3-бис-(оксиметил)хиноксалина 1,4-ди-N-оксидом.

Задачи исследования.

1. Изучить противомикробную и противогрибковую активность новых комплексных соединений цинка с производными диаминопиримидина и хиноксалина, влияющих на воспалительный процесс *in vitro* и *in vivo*.

2. Изучить общетоксическое, раздражающее и аллергизирующее действие новых комплексных соединений цинка в эксперименте.

3. Провести сравнительное изучение иммуномодулирующего, противовоспалительного и антигипоксического действия комплексных соединений цинка.

4. Изучить фармакологическое действие новых комплексных соединений цинка в составе наружных иммобилизованных форм, влияющих на воспалительный процесс в эксперименте.

5. Оценить влияние металлокомплексов цинка в составе наружных иммобилизованных форм на противомикробную активность и на реактивные изменения в тканях при экспериментальном воспалении.

Научная новизна работы. Впервые установлено, что комплексные соединения цинка с производными диаминопиримидина и хиноксалина обладают противомикробной и противогрибковой активностью, местным противовоспалительным, иммуномодулирующим, антигипоксическим действием и относятся к классу малотоксичных веществ.

Установлено, что комплексообразование цинка с производными диаминопиримидина и хиноксалина не только значительно повышает противомикробную активность лиганд, но и расширяет спектр их действия и не оказывает раздражающего и аллергизирующего эффекта в эксперименте на животных.

Проведено сравнительное изучение эффективности новых комплексных соединений цинка в эксперименте на течение стафилококковой и сальмонеллезной инфекции.

Впервые показано выраженное противомикробное действие наружных иммобилизованных форм и оценено их влияние на моделированное воспаление.

Впервые показано антимикробное, противовоспалительное и ранозаживляющее действие наружных иммобилизованных форм, содержащих комплексные соединения цинка при моделировании гнойной раны.

Научно-практическое значение. Результаты проведенных исследований способствуют прогнозированию путей повышения эффективности известных лекарственных средств и биологически активных соединений с целью получения безопасных препаратов, не подавляющих естественный иммунитет человека, что позволяет рекомендовать их для дальнейшего изучения в качестве препаратов выбора при лечении гнойных ран.

Комплексные соединения цинка в составе наружных иммобилизованных форм обеспечивают выраженный противомикробный, обезболивающий, ранозаживляющий и регенерирующий эффекты и являются научно-экспериментальным обоснованием их использования при местном лечении гнойных ран, позволяют значительно улучшить результаты лечения, и легко осуществимы в условиях поликлиники.

Материалы диссертации используются в научно-исследовательской работе и учебном процессе на кафедрах биологической и химической технологии, микробиологии, вирусологии, иммунологии, фармакологии, НИИ Экологической медицины Курского государственного медицинского университета.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Комплексные соединения цинка с производными диаминопиримидина и хиноксалина обладают противомикробной, противогрибковой активностью, противовоспалительным действием по сравнению с лигандами.
2. 0,5-5,0% растворы комплексных соединений цинка не проявляют общетоксического действия, не вызывают раздражающего и аллергизирующего эффекта, повышают индекс активности при экспериментальной стафилококковой и сальмонеллезной инфекции.
3. Комплексные соединения цинка стимулируют факторы неспецифической резистентности, гуморального и клеточного иммунитета и относятся к классу малотоксичных веществ.
4. Комплексные соединения цинка проявляют выраженное антигипоксическое действие при острой гемической и гистотоксической гипоксии превосходя защитный эффект препарата сравнения, а при острой гипоксической гипоксии и при моделировании адреналинового отека легких их действие высоко статистически значимо относительно контроля.
5. Комплексные соединения цинка в составе наружных иммобилизованных форм проявляют выраженную противомикробную активность, обладают противовоспалительным, обезболивающим и ранозаживляющим

действием, обеспечивают атравматичность и пролонгированное высвобождение, и сокращают сроки заживления гнойных ран в эксперименте.

Апробация работы. Основные результаты диссертации доложены и обсуждены на: VIII конференции "Гомеостаз и инфекционный процесс" (Москва, 2007), 73-й Итоговой научной конференции молодых ученых ГОУ ВПО КГМУ «Молодежная наука: от фундаментальной идеи до инновационных проектов» (Курск 2008), Юбилейной научной конференции, посвященной 70-летию Курского государственного медицинского университета «Университетская наука. Взгляд в будущее» (Курск 2005), межвузовских итоговых научных конференциях студентов и молодых ученых: «Молодежная наука и современность» (Курск 2009-2011) , Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Биотехнология, Биомедицинская инженерия» (Курск 2009-2011).

Личный вклад автора. Автором проанализированы отечественные и зарубежные источники по теме диссертационного исследования, проведены серии экспериментов, получены и обобщены результаты исследования, проведена статистическая обработка и анализ полученных данных. Лично проведено моделирование дизайна исследования, научное обоснование и выбор методов исследования. Автор лично участвовал в апробации результатов исследования, в подготовке основных научных публикаций по теме выполненной работы.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 работ, в том числе 3 в журналах из перечня ВАК Минобрнауки РФ, получен патент на изобретение.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 3-х глав собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Она изложена на 141 странице компьютерного текста, содержит 35 таблиц и 4 рисунка. Библиографический указатель включает 141 отечественных и 56 зарубежных литературных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования и методы эксперимента

Экспериментальные исследования работы проводили согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (В.П. Фисенко, Е.В. Арзамасцев, Э.А. Бабаян) с определением LD₅₀(М.А. Беленький, Е.В. Арзамасцев), «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (под редакцией Хабриева Р.У.), «Методическим рекомендациям по экспериментальному (доклиническому) изучению лекарственных препаратов для местного лечения гнойных ран» (Б.М. Даценко, Н.Ф. Калиниченко, В.К. Лепехин), «Методическим рекомендациям по экспериментальному изучению местноанестезирующих средств (Ю.Д. Игнатов, Ю.Н. Васильев, В.Н. Жуков),

«Методическим рекомендациям по выведению животных из эксперимента» (С.А. Куфлина), «Руководству для врачей» (под редакцией М.И. Кузина, Б.М. Костюченко).

Биологическую активность комплексных соединений цинка изучали в эксперименте *in vitro* и *in vivo* с установлением противомикробной, противогрибковой, иммуномодулирующей и антигипоксической активности. С целью установления оценки безопасности комплексных соединений цинка и наружных иммобилизованных форм изучено общетоксическое действие: острая токсичность, раздражающее и аллергизирующее действие.

Изучение фармакологической активности иммобилизованных форм проводили в эксперименте с использованием адекватных экспериментальных моделей лабораторных животных. Экспериментальные исследования были выполнены на теплокровных животных 4 видов (белые мыши массой 18-20 г (442 особи), белые крысы линии Wistar массой 120-150 г (180 особей), кролики массой 2,5-3,0 кг (6 особей), морские свинки массой 320-350 г обоего пола (44 особи). Все исследования проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных Приказом МЗ СССР №75 от 12.08.1977 г.

Для решения поставленных задач применен комплекс современных фармакологических, микробиологических, иммунологических, гистологических, физико-химических и математических методов. Объекты исследования: комплексные соединения, синтезированные на кафедре биологической и химической технологии (лабораторные шифры - TmpZn, DZn), образцы цельной крови, некоторые органы (селезенка, печень) и биологические ткани экспериментальных животных. Растворы лиганд комплексных соединений готовили на стерильном физиологическом растворе натрия хлорида, воде для инъекций и вводили внутривенно и внутримышечно (мыши, крысы, морские свинки, кролики), а также наносили в виде растворов и накожных аппликаций на эпилированные участки кожи спины (крысы, морские свинки) и аппликаций на роговицу глаза (морские свинки, кролики). В контрольных группах животные получали физиологический раствор в эквивалентном объеме.

В экспериментах использовались субстанции комплексных соединений цинка и их иммобилизованные формы, а также дополнительные вещества, полученные с заводов-изготовителей с соответствующими протоколами анализа по требованиям НД (ГФ СССР X и XI изданий, отдельных ВФС и ФС, ГОСТ, ОСТ и ТУ). Определение противомикробной активности в отношении облигатных анаэробных микроорганизмов проводили методом двухслойной агаровой культуры. Противомикробную активность растворов комплексных соединений (концентрация 10 мг/мл) и иммобилизованных форм (0,5%), приготовленных на их основе, в отношении факультативно-анаэробных микроорганизмов определяли *in vitro* методом диффузии в агар, в соответствии с рекомендациями ВОЗ и Государственной фармакопеи. Минимальная подавляющая концентрация комплексных соединений определялась методом серийных разведений. Двукратные разведения препаратов в жидкой

питательной среде проводили от 10,0 до 0,31 мг/мл. Тест-культуры вносили в объеме 0,1 мл взвеси с концентрацией 1 млрд.м.т./мл.

В опытах *in vivo* активность металокомплексов изучали на белых мышах при моделировании: стафилококковой инфекции внутрибрюшинным заражением суточной агаровой культурой *Staphylococcus aureus* №554, в дозе вызывающей гибель 50% мышей в течение 7 суток (1×10^7 микробных клеток в 1 мл); сальмонеллёзного энтероколита внутрибрюшинным заражением взвесью суточной культуры *Salmonella typhimurium* №7 в количестве $8,75 \times 10^3$ микробных тел/мл, вызывавшей гибель 50% мышей в течение 7 суток. Через сутки после заражения в течение 7 дней ежедневно мышам вводили внутримышечно (0,1 мл в дозах 5% ЛД₅₀) изучаемые лиганды и их биокомплексы. Терапевтическую эффективность комплексных соединений оценивали по выживаемости животных. Определение острой токсичности биокомплексов проводили на мышах при внутрибрюшинном способе введения (Беленький М.А., 1963; Arzamastsev E.V., 1988) свежеприготовленных подогретых водных растворов комплексных соединений. Определение показателей токсичности соединений проводилось с использованием комбинированного метода определения ЛД₅₀ и других параметров (ЛД₁₀, ЛД₁₆, ЛД₈₄). В опытах *in vivo* методом Ренье-Валета (Игнатов Ю.Д., Васильев Ю.Н., Жуков В.Н., 1990) изучали местноанестезирующую активность иммобилизованных форм. Действие новых биокомплексов на гуморальный иммунный ответ изучали на крысах. Внутримышечно вводили исследуемые препараты в твине и физиологическом растворе натрия хлорида 1 раз в сутки в течение 5 дней с последующей иммунизацией животных ЭБ и определением в селезенке количества АОК (Мальберг К., Зигль Э., 1987). Из факторов неспецифической защиты определяли фагоцитарную активность лейкоцитов, активность бактерицидных систем фагоцитов (кислородзависимых и кислороднезависимых), резервную функцию системы фагоцитоза, уровень сывороточного лизоцима и БАС (Виксман М.Е., Маянский А.Н., 1979; Дорофейчук В.Г., 1968). Изучение общетоксического, кожнораздражающего и аллергизирующего действия на кожу экспериментальных морских свинок, влияния на некоторые обменные процессы в коже (содержание суммарных липидов, общих и растворимых белков) проведено согласно «Инструкции по экспериментально-клинической апробации косметических средств» (Бобков Ю.Г., 1986). Изучение антигипоксического действия комплексных соединений проводили на 4-х моделях гипоксии: острая гипоксическая гипоксия; острая гемическая гипоксия; острая гистотоксическая гипоксия; адреналиновый отек легких на беспородных мышах обоего пола. Исследуемые вещества вводили внутрибрюшинно однократно в объеме 0,2 мл в дозе 1/10 от ЛД₅₀ с учетом массы тела. В качестве контроля использовался 0,9%-ный физиологический раствор натрия хлорида. В качестве препарата сравнения – натрия оксибутират.

Изучение терапевтической эффективности иммобилизованных форм, содержащих новые комплексные соединения проведено на мышах и крысах при

моделированном воспалении.

Все полученные данные подвергнуты статистической обработке с определением критерия Стьюдента при помощи программы «Biostat», с использованием персонального компьютера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение влияния комплексных соединений на противомикробную активность лиганд представляет большой интерес и может способствовать открытию новых возможностей рациональной терапии гнойных ран. В качестве металла-комплексобразователя нами был выбран цинк, учитывая его исключительно важную физиологическую роль в организме: присутствие во всех органах и тканях человека и высших животных; в обменных процессах (включается в деятельность более 200 ферментов); не заменимый металлокомпонент карбоангидразы, карбоксипептидазы и дрожжевой алкогольдегидразы, дегидразы глютаминовой кислоты и целого ряда других энзимов. В качестве лиганд для комплексобразования с цинком были выбраны производные диаминопиримидина и хиноксалина. Данные химического и элементного анализа, ИК-спектроскопии позволили доказать индивидуальность структуры полученных соединений.

Изучение противомикробного действия новых комплексных соединений по отношению к облигатно-анаэробным микроорганизмам показало отсутствие достоверных различий по отношению к соединениям сравнения, не оказывая отрицательного влияния в отношении основных мишеней действия препаратов. В отношении факультативно-анаэробных микроорганизмов комплексные соединения цинка обладают выраженной противомикробной активностью, так как диаметр зоны задержки роста бактерий значимо выше по сравнению с соединениями сравнения (в 1,5-3 раза) (таблица 1).

Комплекс цинка с производным диаминопиримидина проявил наиболее выраженное антимикробное действие в отношении *S.aureus*, *P. vulgaris*, и *C.albicans*. Противомикробная активность комплексного соединения цинка с производным хиноксалина наиболее значимо проявилась в отношении *B.cereus*, *B. subtilis*, *C. albicans*, в то время как производное хиноксалина в отношении *C.albicans* не проявляло противомикробной активности. Необходимо отметить, что изучаемые комплексные соединения цинка с производным диаминопиримидина и хиноксалина в отношении других изучаемых тест-штаммов проявляли наиболее значимую противомикробную активность, чем соединения сравнения. Так, например, в отношении *P. aeruginosa* (наиболее частого в настоящее время ассоциата гнойной инфекции) диаметр зоны задержки роста значимо выше по сравнению с лигандами (в 1,5-2,0 раза)

Установлено, что Tmp и D оказывают подавляющее действие в отношении изучаемых тест-штаммов в концентрациях 0,63-2,5 мг/мл, а их металлокомплексы с цинком – в концентрациях 0,31 – 0,63 мг/мл, то есть в более низких концентрациях (в 2-4 раза).

Таким образом, комплексообразование цинка с производными диаминопиримидина и хиноксалина не только повышает их противомикробную активность *in vitro*, но и расширяет спектр их действия, что позволило рекомендовать изучаемые комплексные соединения для дальнейших исследований в качестве противомикробных веществ.

Таблица 1

Противомикробная активность лиганд и их комплексных соединений цинка в отношении факультативно-анаэробных микроорганизмов

Тест-культура	Диаметр зоны задержки роста тест-штаммов, в мм (M±m)			
	Tmp	TmpZn	D	DZn
	1	2	3	4
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	11,5±0,5	39,4±1,3 ¹	17,5±0,7	35,1±1,4 ³
<i>S. aureus</i> 209-P	12,7±0,6	34,3±1,4 ¹	18,0±0,7	34,2±1,5 ³
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	10,6±0,4	19,4±0,7 ¹	8,2±0,4	20,5±0,9 ³
<i>B. cereus</i> ATCC 10702	11,4±0,4	19,7±0,3 ¹	7,5±0,3	21,8±0,8 ³
<i>E. coli</i> ATCC 25922	20,4±0,8	38,7±1,5 ¹	12,2±0,5	19,5±0,8 ³
<i>P. aeruginosa</i> NCDC 27853	22,0±0,9	33,1±1,3 ¹	9,5±0,4	18,1±0,8 ³
<i>C. albicans</i> NCTC 2625	7,2±0,4	21,7±1,1 ¹	0	12,5±0,6 ³
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC4636	12,5±0,6	30,0±1,2 ¹	9,0±0,4	14,4±0,6 ³

Примечание: ¹различия данных по отношению к диаминопиримидину достоверно ($p < 0,05$); ³различия данных по отношению к хиноксалину достоверно ($p < 0,05$).

Поскольку далеко не всегда установленное *in vitro* противомикробное действие совпадает с его активностью в живом организме, проведены исследования влияния комплексных соединений цинка при моделировании патологических процессов в опытах на мышах при внутрибрюшинном их заражении культурой *Staphylococcus aureus* №554 и *Salmonella typhimurium* №7.

Проведенные исследования позволили установить значительное увеличение терапевтической активности комплексных соединений цинка *in vivo* по сравнению с лигандами и контролем, т.к. индекс активности возрастал при стафилококковой и сальмонеллезной инфекции в 3-4 раза. Выживаемость животных при лечении лигандами составила 60-70% (в контроле 40-50%), а в случае использования комплексных соединений цинка - 90-100%.

Изучение противогрибковой активности комплексных соединений цинка показало, что их можно отнести к биологически активным веществам с умеренной антимикотической активностью. Следует отметить, что изучаемые соединения относятся к классу малотоксичных веществ. Проведенные исследования позволили установить ЛД₅₀ для: Tmp – 1185±4,20 мг/кг, для D – 1121±50,20 мг/кг, а для комплексных соединений цинка - TmpZn – 610±35,14 мг/кг и DZn – 580±29,15.

Комплексные соединения цинка не проявляют общетоксического действия на экспериментальных животных – аппетит, привес, реактивность, подвижность, состояние кожи и шерсти не отличались от контроля. Металлокомплексы цинка не обладают раздражающим и алергизирующим действием на кожу и конъюнктиву экспериментальных животных в 0,5% - 5,0%-ных концентрациях, не оказывают отрицательного воздействия на

морфологическую структуру кожи и печени, оказывая эффективное противовоспалительное действие - угнетение воспаления через 1 час составляет 20-30%, через 2 часа – 30-35% и через 3 часа – 35-40%. Активность комплексных соединений цинка характеризуется усилением энергетического обмена как углеводного, так и жирового, в частности, более оптимальным их течением, а, следовательно, лучшим энергетическим обеспечением протекающих в организме биохимических процессов, что подтверждает повышенное содержание общих растворимых белков на 40-45% и суммарных липидов - на 20-25%.

Изучено влияние новых комплексных соединений на показатели иммунного ответа. Исследования проведены на белых крысах-самцах при внутримышечном введении препаратов в дозе 5% ЛД₅₀. Анализ полученных данных показал, что введение комплексных соединений цинка с производными диаминопиримидина и хиноксалина активизировало иммуномодулирующее действие на формирование гуморального ответа на ЭБ, о чем свидетельствовало увеличение количества АОК в 2,0-2,3 раза. Одним из факторов антиинфекционной защиты, определяющим дальнейшее развитие инфекционного процесса, является ее неспецифическое звено. Проведенные исследования позволили сделать вывод, что изучаемые комплексные соединения цинка оказывают влияние на фагоцитарную активность лейкоцитов, так как фагоцитарный индекс значительно превышал показатели как контрольной группы, так и групп сравнения. Изменение активности кислородзависимых бактерицидных систем нейтрофилов в тесте восстановления нитросинего тетразолия также свидетельствовало о стимулирующем влиянии комплексных соединений цинка. Возможно, стимуляция бактерицидных систем нейтрофилов способствовала усилению завершенности фагоцитоза под действием изучаемых комплексных соединений цинка. Изменения бактерицидной активности сыворотки крови характеризовались статистически более высокими значениями в группах опытных животных по сравнению с группой контроля.

Известно, что гипоксия бывает причиной самых разнообразных структурно-функциональных нарушений и имеет место при любом патологическом процессе, что обусловило интерес к изучению антигипоксического действия комплексных соединений цинка. Полученные результаты позволили установить, что при острой гемической гипоксии все исследуемые вещества, включая Тmp и D, оказывают защитный эффект, проявляя антигипоксическое действие по сравнению с контролем. Однако антигипоксическим эффектом превосходящим препарат сравнения (натрий оксипутират), обладали комплексные соединения цинка, так как продолжительность жизни экспериментальных животных увеличивалась в 2-2,5 раза по сравнению с контролем. Комплексные соединения цинка при острой гистотоксической гипоксии превышают защитный эффект препарата сравнения в 1,5 раза. При гипоксии с гиперкапнией в гермообъеме и при моделировании адреналинового отека легких комплексные соединения цинка

уступают препарату сравнения (где защитный эффект натрия оксibuтирата особенно выражен), но антигипоксантажное действие остается достаточно высоким по отношению к контролю и статистически значимым (продолжительность жизни животных при этих видах гипоксии в 1,5-4 раза превосходит контроль).

Лиганды проявляют незначительное защитное действие только на модели острой гемической гипоксии и модели адреналинового отека легких, а в остальных случаях достоверных различий по сравнению с контролем и препаратом сравнения не установлено.

Этиология, патогенез и фазность раневого процесса делают необходимым дифференцированно подходить к иммобилизованным формам для местного лечения гнойных ран, так как в практической хирургии основной является методика лечения ран под повязкой различными мазями и гелями. Изучено влияние комплексных соединений цинка на противомикробную активность в составе наружных иммобилизованных форм в опытах *in vitro* методом диффузии в агар (таблицы 2, 3).

Таблица 2

Противомикробная активность производного диаминопиримидина* и его комплексного соединения цинка* в составе иммобилизованных форм

№ гр.	Антимикробный ком-понент / Иммобилизованные формы	Диаметр зоны задержки роста тест-штаммов, мм (M±m)				
		<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>C.albicans</i> NCTC 2625
1.	Tmp +4% -ный гель МЦ	12,0±0,6	18,5±0,9	11,8±0,6	10,4±0,5	6,9±0,3
2.	Tmp+4%-ный гель ПВС	11,8±0,5	18,8±0,8	9,0±0,4	10,0±0,5	6,2±0,3
3.	Tmp+2% -ный гель хитозана	11,9±0,6	18,3±0,9	9,5±0,5	10,2±0,6	6,5±0,4
4.	TmpZn +4% -ный гель МЦ	33,2±1,6 ¹	38,0±1,9 ¹	19,5±0,9 ¹	20,1±1,0 ¹	21,5±1,1 ¹
5.	TmpZn +4%-ный гель ПВС	34,0±1,7 ²	38,0±1,9 ²	20,1±1,0 ²	19,4±0,9 ²	20,8±1,0 ²
6.	TmpZn +2% -ный гель хитозана	33,7±1,7 ³	38,5±1,8 ³	19,8±0,9 ³	19,0±0,9 ³	21,0±1,0 ³

Примечание: цифрами надстрочного индекса обозначены носители мягкой лекарственной формы, в отношении которых различия достоверны (p<0,05); * концентрация производного диаминопиримидина в иммобилизованных формах 0,5

Таблица 3

Противомикробная активность производного хиноксалина* и его комплексного соединения цинка* в составе иммобилизованных форм

№ гр.	Антимикробный компонент / Иммобилизованные формы	Диаметр зоны задержки роста тест-штаммов, мм (M±m)				
		<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>C.albicans</i> NCTC 2625
1	D +4% -ный гель МЦ	16,9±0,8	11,8±0,6	8,0±0,4	7,1±0,3	1,7±0,1
2	D +4%-ный гель ПВС	17,0±0,7	11,7±0,6	7,9±0,3	7,9±0,4	2,0±0,2
3	D 2% -ный гель хитозана	17,5±0,9	12,0±0,7	8,0±0,6	8,0±0,5	1,9±0,1
4	DZn +4% -ный гель МЦ	34,5±1,7 ¹	19,0±0,9 ¹	20,0±1,0 ¹	22,1±1,2 ¹	13,5±0,7 ¹
5	DZn +4%-ный гель ПВС	35,0±1,8 ²	19,0±1,1 ²	20,9±1,1 ²	22,0±1,1 ²	13,0±0,6 ²
6	DZn +2% -ный гель хитозана	34,7±1,6 ³	19,7±1,2 ³	19,8±1,2 ³	22,4±1,3 ³	13,3±0,8 ³

* Примечание: цифрами надстрочного индекса обозначены носители мягкой лекарственной формы, в отношении которых различия достоверны (p<0,05); * концентрация производного хиноксалина в иммобилизованных формах 0,5%

Комплексообразование лекарственных средств различных фармакологических групп с разным механизмом действия способно обеспечить потенцированный синергизм, что позволит снизить дозу и лекарственную нагрузку на организм при оптимизации фармакологического эффекта.

Установлена значимо высокая противомикробная активность иммобилизованных форм, содержащих комплексных соединений цинка тримекаин и янтарную кислоту (таблица 4).

Таблица 4

Противомикробная активность иммобилизованных форм

№ гр.	Иммобилизованные формы	Диаметр зоны задержки роста тест-штаммов, мм (M±m)				
		<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>C.albicans</i> NCTC 2625
1	Tmp, МЦ, (контроль)	12,0±0,6	18,5±0,9	10,4±0,5	10,4±0,5	6,9±0,3
2	Tmp, Тримекаин, янтарная кислота, МЦ, Глицерин	14,5±0,5	20,2±0,4	14,6±0,5	14,6±0,5	10,3±0,5
3	TmpZn, Тримекаин, янтарная кислота МЦ, Глицерин	36,5±1,3 ^{1,2}	40,3±1,2 ^{1,2}	22,4±1,0 ^{1,2}	22,4±0,7 ^{1,2}	12,5±0,6 ^{1,2}

Примечание: 1-достоверность различий средних относительно 1-й группы (p<0,05); 2-достоверность различий средних относительно 2-й группы (p<0,05)

Иммобилизованные формы, содержащие комплексные соединения цинка в своем составе при моделированном воспалении обеспечивают выраженное угнетение экссудативной фазы воспаления через 3 часа эксперимента на 40-45% по сравнению с контролем и достоверно снижают гиперемию в 2,0-

2,5раза. Противовоспалительная эффективность иммобилизованных форм составляет 68-75%, что в 3,9-4,4 раза превосходит противовоспалительную активность иммобилизованной формы-плацебо. Изучаемые иммобилизованные формы, содержащие комплексные соединения цинка не оказывают раздражающего действия на кожу экспериментальных животных, так как индекс раздражающего действия не превышает двух единиц.

Изучение ранозаживляющей активности наружных иммобилизованных форм в эксперименте на животных проводили при моделировании полнослойной гнойной раны. Животные были разделены на несколько групп. Серии эксперимента и результаты представлены в таблице 5.

Комбинирование в составе иммобилизованной формы новых комплексных соединений цинка (TmpZn+DZn) активизирует процессы регенерации и созревания соединительной ткани, а также рост эпителия по поверхности раны, т.е. способствует ранозаживляющей активности в ране как относительно группы контроля (серия 1), так и групп сравнения (серия 2 и серия 4).

Таблица 5

Сроки заживления инфицированной раны в эксперименте
на животных

№ гр.	Наименование группы	Сроки образования струпа, сутки
1.	Животные с моделью инфицированной раны без лечения (серия 1, контроль)	14,7±0,6
2.	Животные с моделью инфицированной раны, лечение иммобилизованной формой, содержащей Tmp (серия 2, группа сравнения)	13,0±0,8 ¹
3.	Животные с моделью инфицированной раны, лечение иммобилизованной формой, содержащей TmpZn + DZn, тримекаин, янтарную кислоту (серия 3, опытная группа)	11,2±0,4 ^{1,2,4}
4.	Животные с моделью инфицированной раны лечение мазью «Левомеколь» (серия 4, группа сравнения)	13,1±0,5 ¹

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

Подтверждением усиления процессов репаративной регенерации являются достоверно более ранние сроки образования струпа. Цитограмма клеток подтверждает ускорение процессов очищения раны и ее регенерации: уменьшается количества нейтрофилов в поле зрения в 1,5-2 раза, увеличивается число макрофагов и фибробластов - в 2 раза.

Таким образом, применение наружных иммобилизованных форм, содержащих комплексные соединения цинка, позволяет получить хороший эффект при лечении гнойных раневых процессов стафилококковой этиологии, обеспечивает противомикробную активность, ранозаживляющее и обезболивающее действие, что и позволяет сократить сроки лечения до 11 суток.

ВЫВОДЫ

1. Комплексные соединения цинка с 5-[(3,4,5-триметоксифенил)метил]-2,4-пиримидиндиамином и 2,3-бис-(оксиметил)-хиноксалина 1,4-ди-N-оксидом проявляют выраженную противомикробную активность, умеренное противогрибковое действие, превосходят по активности соединения сравнения; повышают индекс активности при экспериментальной стафилококковой инфекции в 2,7-3,0 раза, а при сальмонеллезной инфекции - в 2,8-3,4 раза и относятся к классу малотоксичных веществ ($LD_{50} = 610 \pm 35,14$ мг/кг для TmpZn и $LD_{50} = 580 \pm 29,15$ мг/кг для DZn).
2. Комплексные соединения цинка активизируют иммуномодулирующее действие на факторы неспецифической резистентности и формирование гуморального и клеточного иммунного ответа на эритроциты барана, увеличивая количество антителобразующих клеток в 2-2,3 раза.
3. Комплексные соединения цинка оказывают защитный эффект, проявляя более выраженное антигипоксическое действие при острой гемической гипоксии и острой гистотоксической гипоксии, по сравнению с контролем и препаратом сравнения (натрия оксипутират), при острой гипоксической гипоксии и моделировании адреналинового отека легких их антигипоксическое действие уступает препарату сравнения (где защитный эффект особенно выражен), но остается достаточно высоким по отношению к контролю (продолжительность жизни животных возрастает в 1,5-3 раза).
4. Комплексные соединения цинка не проявляют общетоксического действия в 0,5-5,0%-ных концентрациях, кожно-раздражающего (индекс раздражающего действия не превышает 2-х) и алергизирующего эффекта и оказывают эффективное противовоспалительное действие (противовоспалительная эффективность относительно контроля составляла 60-75%), активизируют процессы белкового и жирового обмена веществ (увеличивается содержание суммарных липидов на 20-25%, общих растворимых белков - на 40-45%).
5. Наружные иммобилизованные формы, содержащие комплексные соединения цинка с производными диаминопиримидина и хиноксалина, тримекаин и янтарную кислоту по степени влияния на экспериментальное воспаление, на заживление инфицированных ран и противомикробную активность не уступают действию официальных средств (мазь «Левомеколь»), сочетают многонаправленное действие в терапии гнойно-воспалительных процессов, обеспечивают высокую противомикробную активность, противовоспалительную эффективность и стимуляцию регенеративных процессов поврежденных тканей.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ

1. Комплексные соединения цинка с 5-[(3,4,5-триметоксифенил)метил]-2,4-пиримидиндиамином и 2,3-бис-(оксиметил)-хиноксалина 1,4-ди-N-оксидом проявляют выраженную противомикробную, противогрибковую, иммуномодулирующую и антигипоксическую активность, что определяет перспективность их клинического исследования.

2. Комплексные соединения цинка в составе наружных иммобилизованных форм обеспечивают выраженный противомикробный, обезболивающий, ранозаживляющий и регенерирующий эффекты и являются научно-экспериментальным обоснованием их использования при местном лечении гнойных ран, позволяют значительно улучшить результаты лечения, и легко осуществимы в условиях поликлиники.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Реактивные изменения клетки под влиянием биокомплекса цинка/**Лосицкая О.С.**, Моралев Л.Н., Лазурина Л.П., Заикин А.В., Костров С.В., Букреева Е.М. [и др.]//Сборник трудов VIII конференции "Гомеостаз и инфекционный процесс", Москва, 2007г

2. Повышение антимикробных свойств полимерных лекарственных форм путем химической модификации лигандов/**Лосицкая О.С.**, Заикин А.В., Колоколов С.В., Поляков И.В // Материалы 73-й межвузовской итоговой научной конференции студентов и молодых ученых: «Молодежная наука: от фундаментальной идеи до инновационных проектов». В 2-х частях. - Курск: КГМУ, 2008г. – С.152

3. Свойства хитозана и применение его в качестве полимерных медицинских пленок / **Лосицкая О.С.**, Поляков И.В. // Сборник трудов Всероссийской научно-практической конференции «Биомедицинская инженерия. Биотехнология», посвященный 10-летию биотехнологического факультета - Курск: КГМУ, 2008г. – С. 108-109

4. К вопросу разработки современных раневых покрытий/**Лосицкая О.С.** Старкова Д.А., Поляков И.В.//Сборник трудов Всероссийской научно-практической конференции «Биомедицинская инженерия. Биотехнология», посвященный 10-летию биотехнологического факультета - Курск: КГМУ, 2008г. – С. 165-169

5. Преимущества полимерных лекарственных матриц на основе коллагена при лечении ран / **Лосицкая О.С.**, Старкова Д.А., Хапчаева Д.А., Чудиновский А.П., Костров С.В.// Сборник трудов Всероссийской научно-практической конференции «Биомедицинская инженерия. Биотехнология», посвященный 10-летию биотехнологического факультета - Курск: КГМУ, 2008г. – С. 169-171

6. Изучение и разработка лекарственных форм с высоким уровнем биологической активности/**Лосицкая О.С.**, Букреева Е.М., Чудиновский А.П., Костров С.В., Самохвалова И.В. // Материалы 74-й межвузовской итоговой научной конференции студентов и молодых ученых: «Молодежная наука и современность», посвященной Году молодежи в России. В 3-х частях. - Курск: КГМУ, 2009г. – С.53-54

7. Полимерные композиции на основе коллагена при лечении инфицированных ран / **Лосицкая О.С.**, Букреева Е.М., Карпова Е.В.// Материалы 74-й межвузовской итоговой научной конференции студентов и

молодых ученых: «Молодежная наука и современность», посвященной Году молодежи в России. В 3-х частях. - Курск: КГМУ, 2009г. – С.53-54

8. Изучение и разработка лекарственных форм с высоким уровнем биологической активности/**Лосицкая О.С.**, Букреева Е.М., Чудиновский А.П., Костров С.В., Самохвалова И.В.// Университетская наука и теория, практика, инновации. Сборник 74-й научной конференции КГМУ и сессии Центрально – Черноземного научного центра РАМН. В 3-х частях. - Курск: КГМУ, 2009г. – С.333-334

9. Оценка ранозаживляющего действия мазей /**Лосицкая О.С.**, Букреева Е.М., Хапчаева Д.А., Авдеев А.Ю.// Материалы 76-й межвузовской итоговой научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием: «Молодежная наука и современность». В 3-х частях. - Курск: КГМУ, 2011г. – С.342-343

10. Получение некоторых металлических комплексов сульфометаксозола и триметоприма/ **Лосицкая О.С.**, Петрикеева А.И., Шемякина А.С., Букреева Е.М. Материалы 75-й межвузовской итоговой научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием: «Молодежная наука и современность», посвященная 75-ю КГМУ. В 3-х частях. - Курск: КГМУ, 2010г. – С.45

11. К вопросу о модификации известных антимикробных препаратов/**Лосицкая О.С.**, Букреева Е.М., Завидовская К.В.// Материалы 75-й межвузовской итоговой научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием: «Молодежная наука и современность», посвященная 75-ю КГМУ. В 3-х частях. - Курск: КГМУ, 2010г. – С.27

12. Разработка антимикробных лекарственных форм/ **Лосицкая О.С.**, Самофалов А.С., Басарева О.И., Букреева Е.М.// Сборник трудов III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биотехнология. Биомедицинская инженерия». - Курск: КГМУ, 2010г.- С. 174-175

13. Изучение биологической активности некоторых комплексных соединений металлов /**Лосицкая О.С.**, Костров С.В., Лазурина Л.П., Калущий П.В., Басарева О.И. [и др.] // Врач-аспирант. – 2010. – Вып. 3.1 (40). – С. 129-137.

14. Сравнительный анализ антимикробной активности новых биологически активных соединений и лекарственных форм на их основе [Электронный ресурс] / **Лосицкая О.С.**, Басарева О.И., Костров С.В., Букреева Е.М. [и др.] // Современные проблемы науки и образования : электрон. науч. журн. – 2011. – № 5. – Режим доступа: www.science-education.ru/99-4815, свободный.

15. Биологическая активность некоторых производных сульфаниламида и диаминопиримидина [Электронный ресурс]/**Лосицкая О.С.**, Букреева Е.М., Зиминова Я.В., Самохвалова И.В., Самофалов А.С., Завидовская К.В., Краснов А.А.// Журнал «Современные проблемы науки и образования». – Москва: 2011г.-№3 . – Режим доступа: www.science-education.ru/99-4569., свободный.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АОК	-антителообразующие клетки
БАС	- бактерицидная активность сыворотки крови
ГМПЦ	-гидроксипропилметилцеллюлоза
ДНК	-дезоксирибонуклеиновая кислота
ПВП	-поливинилпирролидон
ПВС	-поливиниловый спирт
РНК	-рибонуклеиновая кислота
Тmp	-производное диаминопиримидина
ТmpZn	-комплексное соединение цинка с диаминопиримидином
D	-производное хиноксалина
DZn	-комплексное соединение цинка с хиноксалином
НСТ	-нитросиний тетразолий
МПК	-минимальная подавляющая концентрация
ЭБ	- эритроциты барана