

## **СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ НА ИХ ОСНОВЕ**

**Басарева О.И., Костров С.В., Букреева Е.М., Хапчаева Д.А., Лосицкая О.С., Зими́на Я.В.**

*ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет», Курск, Россия, e-mail: btf@pochta.ru*

---

**В последние годы повысился интерес к наиболее рациональному использованию уже известных лекарственных средств, а также к возможности их химической модификации. Поэтому целью исследования явилось изучение специфических свойств новых биологически активных соединений *in vitro* и *in vivo*, а также оценка возможности их использования в лекарственных формах.**

---

Ключевые слова: антимикробные препараты, лекарственные формы, биологически активные вещества.

## **COMPARATIVE ANALYSIS OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NEW BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS AND FORMULATIONS ON THEIR BASIS**

Basareva O.I, Kostrov S.V, Bukreeva E.M, Napchaeva D.A, Lositskaya O.S, Zimina Y.V

*Kursk State Medical University, Kursk, Russia, (305 041, Kursk, K. Marks str., e-mail: btf@pochta.ru*

**In recent years, increased interest in the most rational use of already known drugs, as well as to the possibility of chemical modification. Therefore the aim of the study was to investigate the specific properties of new biologically active compounds *in vitro* and *in vivo*, as well as to assess the possibility of their use in dosage forms.**

Key words: antimicrobials, pharmaceutical forms, biologically active substances.

Ретроспективный анализ лечения гнойных ран показал, что одной из ведущих причин развившегося тяжелого гнойного процесса у больных было не только неоправданное использование малоэффективных в настоящее время бензилпенициллинов, цефалоспоринов и аминогликозидов I–II поколений, но и неправомерное использование устаревших препаратов для лечения ран: мази Вишневского, ихтиоловой мази, стрептоцидовой, тетрациклиновой, гентамициновой мази на жировой основе [1].

Это подтверждается тем, что вышеперечисленные препараты не обладают необходимой антимикробной активностью, не обеспечивают обезболивающего, противовоспалительного и осмотического эффекта. Многочисленными исследованиями показано, что изменилась структура возбудителей гнойных ран, которая наряду с грамположительными и грамотрицательными аэробными микроорганизмами включает значительную долю анаэробных микроорганизмов и грибов. От 80 до 100% выделяемых штаммов нечувствительны к пенициллину, цефалтину, цефазолину, тетрациклину, канамицину, гентамицину [2] и к традиционным антисептикам, а также к старым мазям на ланолин-вазелиновой основе. Так, например, растворы фурациллина, риванола, 3%-ной борной кислоты практически полностью утратили антимикробную активность по отношению к основным возбудителям гнойной инфекции, а чувствительность госпитальных штаммов *S.aureus*, *E.coli*, *B.coli* к антисептикам и мазям на жировой основе не превышает 1–5%. Формирование устойчивости микроорганизмов к

широко используемым старым препаратами вызывает необходимость поиска новых групп лекарственных средств с широким спектром биологической активности в отношении не только аэробных, но и анаэробных штаммов и грибов.

Раневой процесс представляет собой совокупность сложных реакций, развивающихся в организме в ответ на повреждение тканей. Поэтому при выборе лекарственных средств необходимо учитывать фазу воспалительного процесса. В отечественной литературе наиболее известна теория течения раневого процесса, включающая следующие фазы: воспаление, делится на период сосудистых изменений и период очищения раны от некротических тканей; регенерация – образование и созревание грануляционной ткани; фаза реорганизации рубца и эпителизации [1]. Зарубежные авторы различают следующие фазы или периоды заживления гнойных ран: коагуляция, воспаление и фиброплазия.

Приведенные классификации достаточно точно отражают основные этапы течения раневого процесса и позволяют определить патогенетически направленное лечение соответственно фазе заживления раны.

За последние годы создан ряд лекарственных препаратов [3], принципиально новых по механизму действия на определенную фазу раневого процесса и на видовой состав микрофлоры ран, которые позволяют быстро ликвидировать острый гнойный процесс, сократить сроки пребывания больных в стационаре. К таким препаратам относятся новые мази на полиэтиленоксидной основе (сплав ПЭО-1500 и ПЭО-400): левосин, левомеколь, диоксиколь и т.д. Эти мази отличаются прежде всего многонаправленностью действия, широким спектром антимикробной активности.

Для приготовления мягких лекарственных форм в настоящее время используются различные мазевые основы: липофильные, гидрофильные и липофильно-гидрофильные. Все эти основы имеют как свои достоинства, так и недостатки и предназначены для различных целей лечения. Однако в последние годы всё больше внимания привлекают гидрофильные гелевые основы [1]. Эти основы хорошо растворимы в воде, равномерно распределяются на поверхности раны или на слизистой и не препятствуют высвобождению лекарственных веществ. Оказывают охлаждающее действие при нанесении на кожу за счет испарения воды. Кроме того, гидрофильные гели из-за высокой осмотической активности способны поглощать значительные объемы межклеточного экссудата при гнойной патологии и часто используются в составе мазей для лечения гнойных ран, не оказывая отрицательного влияния на обезвоживание клеток кожи или слизистой при длительном контакте.

Цель исследования: поиск новых биологически активных веществ на основе производных б-аминопенициллановой кислоты, нитроимидазола и нитрофурана.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование 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): *Clostridium perfringens* 271, *Bacteroides fragilis* 323, *Bacteroides melaninogenicus* 1011, *Fusobacterium necrophorum* VPJ 2523, *Peptococcus magnus* 336, *Peptostreptococcus* НС.

Антибактериальную активность лиганд, а также их производных и лекарственных форм, приготовленных на их основе, в отношении факультативно анаэробных микроорганизмов определяли *in vitro* методом диффузии в агар [4]. В соответствии с рекомендациями ВОЗ и ГФ для оценки активности новых производных в качестве тест-культур использовали штаммы факультативно-анаэробных бактерий и грибов из коллекции ГИСК им. Л.А. Тарасевича (г. Москва): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* 209-Р, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 10702, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* NCTC 2625.

Биологическую активность биоконплексов *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 ( $1 \times 10^7$  микробных тел/мл), и через сутки после заражения в течение 7 дней ежедневно внутримышечно вводили исследуемые препараты. Терапевтическую эффективность новых производных оценивали по выживаемости животных.

Все полученные данные подвергнуты статистической обработке с определением критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ многочисленных исследований, выполненных в разных странах, показал, что клиническая эффективность антибиотиков достигла предела. Кроме того, возможности для открытия новых препаратов практически исчерпаны, и поэтому основные усилия, по мнению большинства исследователей, должны быть направлены на повышение эффективности и усовершенствование уже известных лекарственных средств. В связи с этим модификация широко используемых антимикробных препаратов становится одним из основных вопросов современной медицины, так как изыскание низкотоксичных антибактериальных веществ с механизмом действия, отличным от такового у антибиотиков, является актуальной задачей.

С помощью химической модификации нами были получены новые биологически активные соединения на основе производных б-аминопеницилановой кислоты, нитроимидазола и нитрофурана. Основным преимуществом выбранных лиганд является то, что они обладают достаточной противомикробной активностью, доступностью и дешевизной.

С помощью интернет-системы прогноза на основе компьютерной программы PASS нами была исследована биологическая активность новых химических производных. Шифр препаратов: производные 6-аминопенициллановой кислоты (Amc-27, Amc-29); нитроимидазола (Mn-27, Mn-29); нитрофурана (Fc-27, Fc-29, Fd-27, Fd-29).

Программа носит название PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), а ее современная версия прогнозирует 900 видов биологической активности по структурной формуле химического вещества, включая основные и побочные фармакологические эффекты, механизмы действия, мутагенность, канцерогенность, тератогенность и эмбриотоксичность.

Работа PASS основана на анализе зависимостей «структура–активность» для веществ из обучающей выборки, содержащей более 46 000 разнообразных биологически активных веществ (субстанции известных лекарственных препаратов и фармакологически активные соединения). Используемый в PASS математический алгоритм был отобран путем целенаправленного анализа и сравнения эффективности для решения подобных задач большого числа различных методов.

Точность прогноза в 85% достаточна для практического применения системы PASS с целью прогноза спектра биологической активности новых веществ, поскольку ожидаемая вероятность случайного угадывания одного из 900 видов активности составляет около 0,1%.

В нашем исследовании установлено, что при введении металла (цинк и кобальт) в структуру лекарственного средства (метронидазол) прогнозируется увеличение антибактериальной активности в 2 раза по сравнению с лигандом, а также увеличение в 2–3 раза противовоспалительной, дерматологической, противоаллергической и противоязвенной активности.

Кроме того, при введении металлов в структуру лиганда прогнозируется появление новых активностей, не имеющих место у исходного лиганда, например противомикобактериальной, анальгезирующей, противовирусной, антисептической активностей.

Таким образом, использование системы PASS позволяет: определить, какие тесты наиболее адекватны для изучения биологической активности конкретного химического соединения; обнаружить новые эффекты и механизмы действия для ранее изученных веществ; отобрать наиболее вероятные базовые структуры новых лекарств с требуемым биологическим действием среди доступных для скрининга химических соединений.

Антимикробная активность синтезированных комплексов была исследована в отношении тест-штаммов микроорганизмов, рекомендованных ГФ-ХІ.

В результате проведенных исследований противомикробной активности изучаемых новых производных по отношению к облигатно-анаэробным микроорганизмам установлено, что относительно исходных лиганд отсутствуют достоверные различия (табл. 1, 2).

Выявлено, что химическая модификация исходных лиганд приводит к повышению антимикробной активности новых производных, так как диаметр зоны задержки роста в отношении изучаемых тест-микробов по сравнению с исходными лигандами значительно увеличивался, а также снижалась минимальная подавляющая концентрация (0,31–0,63 мг/мл), что позволяет более чем в 2,5 раза снизить антимикробную нагрузку на организм.

Изучение антимикробной активности новых производных *in vivo* на лабораторных животных показало увеличение их терапевтической активности по сравнению с исходными лигандами, причём препараты не проявляли общетоксического действия.

С учетом результатов проведенных испытаний были разработаны составы технологий получения мягких лекарственных форм на гидрофильных основах.

В настоящее время медицина располагает рядом лекарственных средств для местного воздействия на указанную патологию, но они не все в полной мере отвечают современным требованиям клиницистов.

Независимо от этиопатогенеза гнойно-воспалительные процессы характеризуются наличием болевого синдрома, патогенной микрофлоры, гнойного экссудата, избыточной гидратации и т.д. Поэтому научно обоснованное сочетание в лекарственной форме активных субстанций и вспомогательных веществ, направленно действующих на каждый фактор воспаления, является залогом успешной фармакотерапии. Многолетние исследования по изучению механизма раневого процесса и возможностей их корригирования на отдельных этапах, проводимые в нашей стране и за рубежом, создают условия для выработки объективных критериев, позволяющих проводить аргументированный подбор как самих материалов, на основе которых создаются лекарственные формы, так и их рецептуры. Наиболее перспективно применение многокомпонентных мазей, сочетающих в своем составе местные анестетики и антисептики, в комплексе оказывающих многонаправленное действие на раневой процесс.

При разработке мази учитывается природа носителя, так как она имеет большое влияние на терапевтическую активность лекарственных веществ в мазях. В связи с этим выбор мазевой основы мы осуществляли с учетом требований современной медицины и особенно с учетом такого показателя, как способность основ к высвобождению действующих веществ.

В качестве основы использовались модифицированные производные целлюлозы (метилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, гидроксиметилцеллюлоза) и полиэтиленоксиды с дополнительным включением ряда целевых добавок.

Антимикробную активность мазей исследовали вначале в опытах *in vitro* методом диффузии в агар. Анализ полученных данных показал, что мази на гидрофильных основах в отношении всех изученных тест-штаммов обладают выраженной антимикробной активностью, так как диаметры зон задержки роста микроорганизмов увеличивались в 1,5–2 раза, а

гидрофильные основы способствовали более полному проявлению антимикробной активности новых производных.

**Таблица 1 – Активность производных 6-аминопенициллановой кислоты и нитроимидазола в отношении анаэробных микроорганизмов**

Вид микроорганизма	Интенсивность роста микроорганизмов																	
	Концентрация и шифр препарата (мг/мл)																	
	0,05						0,1						0,2					
	Amc	Amc-27	Amc-29	Mn	Mn-27	Mn-29	Amc	Amc-27	Amc-29	Mn	Mn-27	Mn-29	Amc	Amc-27	Amc-29	Mn	Mn-27	Mn-29
<i>C.perfringens</i> 271	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	++	++	+++	++	++	++	+	+	++	+	+
<i>B. fragilis</i> 323	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	++	++	+++	++	++	++	+	+	++	+	+
<i>B. melaninogenicus</i> 1011	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	++	++	++	+	++	++	+	+
<i>F.necrophorum</i> VPJ 2523	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	++	++	++	+	++	++	+	+
<i>P. magnus</i> 336	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	++	++	++	+	++	++	+
<i>Peptostreptococcus</i> HC	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	++	++	++	+	++	++	+

+++ – несчитываемое количество колоний;  
 ++ – сотни колоний;  
 + – десятки колоний.

**Таблица 2 – Активность производных нитрофурана в отношении анаэробных микроорганизмов**

Вид микроорганизма	Интенсивность роста микроорганизмов																	
	Концентрация и шифр препарата (мг/мл)																	
	0,0125						0,025						0,05					
	Fc	Fc-27	Fc-29	Fd	Fd-27	Fd-29	Fc	Fc-27	Fc-29	Fd	Fd-27	Fd-29	Fc	Fc-27	Fc-29	Fd	Fd-27	Fd-29
<i>C.perfringens</i> 271	+++	++	++	+++	++	++	+++	++	++	+++	+	+	++	+	+	++	+	+
<i>B. fragilis</i> 323	+++	++	++	+++	++	++	+++	++	++	+++	+	+	++	+	+	++	+	+
<i>B. melaninogenicus</i> 1011	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	++	++	+++	+	++	++	+	++	++	+	+
<i>F.necrophorum</i> VPJ 2523	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	++	++	+++	+	++	++	+	++	++	+	+
<i>P. magnus</i> 336	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	++	+	++	++	+	++	+	+
<i>Peptostreptococcus</i> НС	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	++	+	++	++	+	++	+	+

+++ – несчитываемое количество колоний;

++ – сотни колоний;

+ – десятки колоний.

Использование гидрофильных основ обеспечит быструю доставку биологически активных веществ как к микробным клеткам, так и к клеткам ткани, что будет способствовать повышению терапевтической активности новых производных. Кроме того, дегидратирование гидрофильной основой клеток грамположительных микроорганизмов снижает их сопротивляемость, что также способствует повышению терапевтической активности разработанных мягких лекарственных форм.

Дополнительное включение ряда целевых добавок (местноанестезирующие вещества, антисептики) позволило обеспечить усиление антимикробного действия изучаемых производных, а также анестезирующее и противовоспалительное действие, что имеет большое значение для фармакологического средства. Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

- химическая модификация производных б-аминопенициллановой кислоты, нитроимидазола и нитрофурана обеспечивает получение биологически активных веществ, обладающих антимикробной активностью;
- разработаны составы и технология получения мягких лекарственных форм, обладающих высокой терапевтической эффективностью.

### **Список литературы**

1. Раны и раневая инфекция : руководство для врачей / под. ред. М.И. Кузина, Б.М. Костюченко. – 2 изд., перераб. и доп. – М. : Медицина, 1990. – 592 с.
2. Фельдштейн М.М. Полимерные покрытия для лечения ран и ожогов // Итоги науки и техники. Серия «Химия и технология высокомолекулярных соединений». – М. : ВИНТИ, 1981. – Т. 16. – С. 120.
3. Краснов А.А. [и др.]. Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – М., 2003. – Т. 2. – № 3. – С. 225–227.
4. Государственная фармакопея СССР. – XI изд. – М. : Медицина, 1990. – Вып. 2. – 397 с.

### **Рецензенты:**

Артюшкова Е.Б., д.б.н., директор НИИЭМ ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России, г. Курск.

Покровский М.В., д.м.н., профессор, с.н.с, НИИЭМ ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России, г. Курск.

Степанова Э.Ф., д.фарм.н., профессор, профессор кафедры технологии лекарств ГБОУ ВПО «Пятигорская государственная фармацевтическая академия», г. Пятигорск.

**Работа получена 12.11.2011**