

ВЛИЯНИЕ НОВЫХ КОМПЛЕКСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЖЕЛЕЗА В СОСТАВЕ ПОЛИМЕРНЫХ ФОРМ НА МОДЕЛИРОВАННОЕ ВОСПАЛЕНИЕ

Тихонова Я. В., Самофалов А. С., Артюшкова Е. Б., Калущий П. В., Лазурина Л. П.

ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет Минздрава России», Курск, Россия (305041, г. Курск, ул. К. Маркса, 3), e-mail: btf@pochta.ru

Проблема лечения гнойных ран далека от разрешения в связи с появлением резистентных и полирезистентных форм микроорганизмов к имеющимся антибактериальным препаратам. 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. Постоянное внимание к этой сложной и актуальной проблеме объясняется также увеличением числа гнойно-воспалительных заболеваний, тяжестью их течения, прогрессирующим возрастанием антибиотикоустойчивых и антибиотикозависимых микроорганизмов. Цель исследования заключалась в изучении влияния иммобилизованных форм, содержащих новые производные железа и меди, на воспаление в эксперименте. Применение комбинированных гелей, содержащих комплексные соединения железа и нитроимидазола цинка с производными β -пиридинкарбоновой кислоты позволило получить хороший эффект при лечении гнойных раневых процессов стафилококковой этиологии, так как обеспечило высокую противомикробную активность, обезболивающий эффект и регенеративное действие, влияющие на сроки лечения ран.

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

THE IMPACT OF NEW COMPLEX COMPOUNDS OF IRON IN THE POLYMER FORMS ON A SIMULATED INFLAMMATION

Tihonova Y. V., Samophalov A. S., Artuchkova E. B., Kalutsky P. V., Lazurina L. P.

Kursk State Medical University, Kursk, Russia (305041, Kursk, K. Marks str., 3), e-mail: btf@pochta.ru

The problem of the treatment of purulent wounds far from being resolved due to the emergence of resistant and MDR microorganisms to available antibacterial drugs. The conception of the wound process is constantly changing along with the development of medicine, microbiology and technical sciences, and is under permanent attention of clinicians, so it is gaining medical and social importance. The constant attention to this complex and topical problem is explained by the increasing number of purulent inflammations, their severity, progressive resistance to antibiotics, and antibiotic dependent microorganisms. The objective of the study was to examine the influence of immobilized forms containing new derivatives of iron and copper, the inflammation in the experiment. The application of the combined gels containing the complex compounds of ferrum and zinc nitroimidazole with derivatives of β -pyridine carbonic acid allowed to obtain the positive effect in managing the purulent wounds of staphylococcal etiology since it could provide high antimicrobial activity, anesthetic effect, and regenerative action influencing the period of wound treatment.

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

Введение

Проблема лечения гнойных ран и раневой инфекции издавна является одной из важнейших в медицине, занимая ведущее место в хирургической заболеваемости. Обусловлено это изменившимся характером патогенных микроорганизмов, сложностью в выборе лечебной тактики, отсутствием унифицированных антибактериальных средств и методов лечения.

Ранее в проведенных исследованиях было показано, что комплексные соединения железа обладают выраженной противомикробной активностью, проявляя иммуномодулирующие свойства, и относятся к классу малотоксичных веществ. Поэтому целью

исследования явилось изучение влияния новых комплексных соединений в составе полимерных форм на моделированное воспаление.

Материалы и методы исследования

Для решения поставленных задач применен комплекс фармакологических, микробиологических и гистологических методов анализа. Все экспериментальные работы проводили согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (В. П. Фисенко, Е. В. Арзамасцев, Э. А. Бабаян) [1] с определением LD₅₀ (М. А. Беленький, Е. В. Арзамасцев) [1, 2], согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (под редакцией Хабриева Р. У.) [6], «Методических рекомендаций по экспериментальному (доклиническому) изучению лекарственных препаратов для местного лечения гнойных ран» (Б. М. Даценко, Н. Ф. Калиниченко, В. К. Лепехин) [3], «Методических рекомендаций по экспериментальному изучению местноанестезирующих средств» (Ю. Д. Игнатов, Ю. Н. Васильев, В. Н. Жуков) [4], «Руководства для врачей» (под редакцией М. И. Кузина, Б. М. Костюченко) [5]. В процессе экспериментальных исследований комплексных соединений были использованы теплокровные животные 3 видов (белые крысы линии Вистар массой 180–220 г, кролики породы Шиншилла массой 2,5-3,0 кг, морские свинки массой 320-350 г) обоего пола.

Объекты исследования: соединения, синтезированные на кафедре биологической и химической технологии КГМУ под лабораторными шифрами: PMnFe, PFdFe; образцы цельной крови и биологические ткани экспериментальных животных. При выполнении работы были использованы штаммы микроорганизмов и грибов, полученные из коллекции ГИСК им. Л. А. Тарасевича (г. 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.

Для изучения терапевтической эффективности полимерных форм, содержащих новые комплексные соединения, на крысах моделировали гнойную рану. Полнослойные кожные раны 2x2 см наносили крысам под эфирным наркозом на лишенном волосяного покрова участке спины в области холки. Инфекцию кожной раны вызывали путем нанесения на поверхность раны взвеси суточной агаровой культуры *Staphylococcus aureus* № 552 в количестве 0,2 мл с концентрацией 1 млрд.м.т./мл с последующим ушиванием раны. Спустя 3 суток в ране развивался воспалительный процесс с выраженным отеком и гиперемией кожного покрова. Исследованию подвергались биоптаты края (дна) раны до начала и в процессе лечения (3,5,7,11,14 сутки) изучаемыми металлокомплексами (основные группы

животных), лигандами и мазью «Левомеколь» (группы сравнения животных) и группа животных без лечения (контрольная группа). Для получения биоптата иссекался участок ткани на всю глубину раны, фиксировался в 10–12 % растворе нейтрального формалина с последующей проводкой по восходящим спиртам. Приготовленные срезы окрашивались гематоксилин-эозином. Препараты исследовались методом световой микроскопии. Все полученные данные подвергнуты статистической обработке с помощью программного комплекса «Биостатистика».

Результаты исследования и их обсуждение

Для повышения биологической активности известных лекарственных средств применен целенаправленный синтез комплексных соединений железа с производными нитроимидазола и нитрофурана. В качестве препаратов сравнения при определении противовоспалительного действия служили полимерные формы, содержащие производные нитроимидазола и нитрофурана.

Изучали влияние полимерных форм, содержащих комплексные соединения железа, на острое экссудативное воспаление конечности крыс по стандартной методике.

Исследуемые иммобилизированные формы наносили на лапку в количестве 250 мг. Повторные измерения объема лапки крысы проводили спустя 3 часа, в момент наибольшего развития воспалительного отека при данной модели, окончательное измерение объема лапки проводили через сутки, на стадии затухания острого экссудативного воспаления лапки крысы. Прирост объема лапки составлял степень выраженности стадии экссудации. Для сравнения изучали влияние на воспалительный процесс основы – плацебо (5 %-ный гель ГПМЦ). В результате проведенного исследования было установлено, что изучаемые полимерные иммобилизированные формы, содержащие комплексные соединения железа, обладали выраженной противэкссудативной активностью, достоверно отличались от иммобилизированных форм, содержащих лиганды (таблица 1).

Таблица 1. Динамика воспалительного отека (мл)

Группы животных	Объем лапки исходный	P,%	Объем лапки через 3 часа	Объем лапки через сутки
Нелеченные животные, n = 6	1,07±0,04		1,65±0,07	1,21±0,05
Животные, получавшие гель-плацебо, n = 6	1,02±0,05	4,67 p>0,05	1,50±0,08	1,15±0,06
Животные, получавшие гель с РМп, n = 6	0,97±0,04	9,34 p>0,05	1,24±0,06	0,05±0,05

Животные, получавшие гель с PMnFe, n =6	0,95±0,05	11,21 p>0,05	1,14±0,05	0,97±0,04
Животные, получавшие гель с PFd, n =6	0,96±0,04	10,28 p>0,05	1,20±0,06	1,06±0,05
Животные, получавшие гель с PFdFe, n =6	0,93±0,05	13,08 p>0,05	0,15±0,05	0,99±0,04

Примечание: p – показатель достоверности отличий к объему лапок на исходном уровне к группе нелеченых животных (контроль); % – к показаниям нелеченых животных.

Изучаемые гели, содержащие лиганды, проявляли схожее противоэкссудативное действие. Снижение стадии экссудации отмечалось и через 3 часа, и через сутки после индукции экспериментального воспаления как для животных, получавших гели с PMn и PFd, так и для животных, получивших гели с PMnFe и PFdFe. Через 3 часа эксперимента действие гелей, содержащих лиганды (PMn и PFd), обеспечивало выраженное угнетение экссудативной фазы воспаления: отек был на 28,98 % и 31,78 % меньше, чем в контроле (нелеченые животные). Через сутки этот показатель был меньше показателя контрольной группы (нелеченые животные) на 5,60 % и 3,73 % (p<0,05) соответственно. Через 3 часа эксперимента действие гелей, содержащих комплексные соединения железа (PMnFe и PFdFe) обеспечивало выраженное угнетение экссудативной фазы воспаления: отек был на 36,45 % и 33,65 % меньше, чем в контроле (нелеченые животные). Через сутки этот показатель был меньше показателя контрольной группы (нелеченые животные) на 11,21 % и 7,47 % (p<0,05) соответственно. Противовоспалительную эффективность исследуемых образцов гелей рассчитывали по формуле:

$$P = [(V_k - V_0)/V_k] \cdot 100\% , \text{ где:}$$

P – процент угнетения воспаления,

V_k – среднее увеличение объема отежной лапки в контроле,

V_0 – среднее увеличение объема отежной лапки у леченых животных.

$$P_{ГП\text{PMn}} = [(0,58 - 0,27)/0,58] \cdot 100\% = 53,43\% \quad P_{ГП\text{PMnFe}} = [(0,58 - 0,19)/0,58] \cdot 100\% = 67,24\%$$

$$P_{ГП\text{PFd}} = [(0,58 - 0,24)/0,58] \cdot 100\% = 58,62\% \quad P_{ГП\text{PFdFe}} = [(0,58 - 0,22)/0,58] \cdot 100\% = 62,07\%$$

$$P_{ГП\text{-плацебо}} = [(0,58 - 0,48)/0,58] \cdot 100\% = 17,24\%$$

Противовоспалительная эффективность гелей, содержащих лиганды (PMn и PFd), составляла 53,43 % и 58,62 % соответственно, а противовоспалительная эффективность иммобилизованных форм, содержащих комплексные соединения железа (PMnFe и PFdFe), составляла 67,24 % и 62,07 % соответственно. Противовоспалительная эффективность геля-плацебо составляла – 17,24 %.

Таким образом, противовоспалительная активность гелей, содержащих лиганды (PMn

и PFd), в 3,1 и 3,4 раза превосходила гель-плацебо. В случае иммобилизованных форм, содержащих комплексные соединения железа (PMnFe и PFdFe), противовоспалительная активность в 3,9 и 3,6 раза превосходила гель-плацебо соответственно.

Анализ результатов динамики развития гиперемии позволил установить, что у животных, получавших гели, содержащие PMn и PFd, через 3 часа эксперимента гиперемия была меньше относительно контроля в 1,8 и 1,9 раза соответственно, а у животных, получавших иммобилизованные формы, с содержанием PMnFe и PFdFe гиперемия снижалась в 2,4 и 2,1 раза соответственно. Через сутки у животных, получавших иммобилизованные формы, с содержанием PMnFe и PFdFe, гиперемия снижалась в 2,0 и 1,7 раза относительно контроля.

Все ингредиенты (кроме комплексных соединений железа с производными нитроимидазола и нитрофурана), входящие в состав полимерных форм, являются официальными препаратами с хорошо изученными свойствами, в том числе и токсикологическими характеристиками. Комбинация изучаемых комплексных соединений железа фармакологическими веществами предлагается впервые, так как позволяет предположить возможность фармакологического синергизма входящих ингредиентов в иммобилизованные формы.

Изучение влияния иммобилизованных форм, содержащие комплексные соединения железа (PMnFe и PFdFe) на раздражающее действие проведено *in vivo* на переднем сегменте слизистой оболочки глаза морских свинок и кроликов, $n=3$. Оценку раздражающего действия проводили по 5-ти бальной шкале *in vivo* на слизистой оболочке глаз животных через 30 секунд и 2 минуты по выраженности отека и гиперемии. Лабораторные образцы гелей, содержащие PMnFe и PFdFe, закладывали под верхнее веко экспериментальных животных, после чего делали заключение об оценке раздражения, которое складывалось из суммирования балла гиперемии и балла отека. Соотношение методу площадью, захваченной эритемой и отеком на экспериментальной слизистой оболочке конъюнктивы и площадью контрольной, определяло индекс первичного раздражения. Вещества, вызывающие реакцию с индексом 1–2, являются слабыми раздражителями, с индексом 3–5 – умеренными, а с индексом больше 5 – сильными. Второй глаз экспериментального животного служил в качестве контроля. Значение раздражающего действия геля-плацебо (контроль) через 2 минуты равно 2 балла, то есть слабое раздражающее действие. В гелях, содержащих PMn и PFd, значение раздражающего действия было 2 балла и 3 балла соответственно, что соответствует умеренному раздражающему действию изучаемых гелей. В гелях, содержащих PMnFe и PFdFe, значение раздражающего действия было равно 1 баллу и 2 баллам соответственно, что соответствует очень слабо выраженному раздражающему действию.

Аналогичные результаты были получены на слизистой оболочке глаза кроликов. Проведенные исследования позволили сделать вывод, что гель-плацебо и гели, содержащие PMnFe и PFdFe, при применении на слизистую оболочку обладают слабо выраженным раздражающим действием, а гели, содержащие PMn и PFd, – умеренным раздражающим действием.

Таким образом, гели, содержащие комплексные соединения железа, являются безопасными по действию на слизистые оболочки экспериментальных животных по месту их применения и могут быть рекомендованы для дальнейшего изучения с целью применения для лечения и профилактики воспалительных процессов инфекционной и неинфекционной этиологии.

Кожно-раздражающее действие изучаемых гелей оценивали по выраженности отека и гиперемии скарифицированной кожи морских свинок и кроликов. Кожную реакцию оценивали через сутки на поврежденной правой стороне и сравнивали с интактным (левым) боком экспериментального животного. Результаты раздражения кожи экспериментальных животных оценивали по 5-ти балльной шкале, суммируя баллы гиперемии и баллы отека. Результаты по изучению местно-раздражающего действия на морских свинках и кроликах свидетельствовали о том, что гели, содержащие комплексные соединения железа PMnFe и PFdFe, вызывали эффект с индексом $1,2 \pm 0,07$ и $1,4 \pm 0,08$ соответственно, через 1 сутки после их нанесения, при этом интенсивность кожной реакции составляла $1,2 \pm 0,05$ и $1,3 \pm 0,06$ соответственно. При регистрации кожной реакции через трое суток интенсивность кожной эритемы составляла $1,0 \pm 0,05$ и $1,3 \pm 0,06$ балла, а индекс раздражающего действия – $1,1 \pm 0,06$ и $1,2 \pm 0,07$ соответственно.

Таким образом, комплексные соединения железа в составе гелей обладали слабым раздражающим действием на кожу экспериментальных животных, так как индекс раздражающего действия не превысил 2. Поэтому представляло интерес изучение противомикробной активности лабораторных образцов гелей, содержащих изучаемые комплексные соединения железа, местный анестетик и никотиновую кислоту или ее комплексное соединение с цинком, с целью применения для лечения гнойных ран в эксперименте. Контролем служил гель, содержащий вместо комплексных соединений производные нитроимидазола и нитрофурана. Результаты микробиологических исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2. Противомикробная активность комбинированных полимерных гелей

№ гр.	Состав гелей	Диаметр зоны задержки роста тест-штаммов, мм ($M \pm m$)				
		<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	PMn, ХС, Тримекаин	18,8±0,9	17,2±0,4	18,6±0,7	18,8±0,8	18,2±0,6
2	PMnFe, ХС, Тримекаин	28,9±1,5 ¹	27,8±1,4 ¹	28,6±1,5 ¹	28,8±1,3 ¹	28,7±1,4 ¹
3	PMnFe, PNcZn, ХС, Тримекаин	38,4±1,8 ^{1,2}	40,5±2,0 ^{1,2}	37,2±1,9 ^{1,2}	38,3±1,9 ^{1,2}	30,8±1,5 ^{1,2}

Примечание: PMn – производное нитроимидазола; PMnFe – комплексное соединение железа с производным нитроимидазола; PNcZn – комплексное соединение цинка с производным β-пиридинкарбоновой кислоты; 1 – достоверность различий средних относительно 1-й группы (p<0,05); 2 – достоверность различий средних относительно 2-й группы (p<0,05).

Как следует из полученных данных, комбинированные гелевые формы, содержащие комплексные соединения железа и цинка с производными нитроимидазола и β-пиридинкарбоновой кислоты, достоверно имели более значимую противомикробную активность по сравнению с полимерными формами, содержащими лиганды, диаметр зоны задержки роста возрастал в отношении изучаемых штаммов в 1,5–2,5 раза.

Изучение ранозаживляющей активности гелей проводили на модели полнослойной гнойной раны в эксперименте на лабораторных животных (крысы линии Вистар). Животные были разделены на несколько групп: животные с моделью инфицированной раны без лечения (серия 1 – контрольная группа); животные с моделью инфицированной раны, для лечения которых использовался гель, содержащий производное нитроимидазола (PMn) (серия 2 – группа сравнения); животные с моделью инфицированной раны, для лечения которых применялся гель, содержащий комплексные соединения железа и с производными нитроимидазола (PMn) и β-пиридинкарбоновой кислоты (серия 3 – опытная группа); животные с моделью инфицированной раны, для лечения которых использовалась мазь «Левомеколь» (серия 4 – группа сравнения). Высокая скорость заживления ран в первые 5 суток наблюдения свидетельствует о фармакологической активности лабораторных образцов гелей в фазу экссудации. Цитограмма клеток подтверждала ускорение процессов очищения раны и ее регенерации: уменьшение количества нейтрофилов в поле зрения в 1,5 раза, увеличение числа макрофагов и фибропластов в 2,0-2,5 раза. Проведенные гистологические исследования позволили установить, что введение в состав гелей новых комплексных соединений железа и цинка в комбинации PMnFe и PNcZn активизировало процессы регенерации и созревания соединительной ткани, а также рост эпителия по поверхности раны, т.е. способствовало ранозаживляющей активности в ране как относительно группы контроля (серия 1), так и групп, которым применяли для лечения гель, содержащий производное PMn (серия 2) и мазь «Левомеколь» (серия 4). Изменения площади гнойных ран, клинические, микробиологические и гистологические данные, полученные в ходе исследования регенеративного действия гелей, содержащих комплексные соединения железа и цинка, свидетельствовали об их высокой терапевтической активности. Имобилизированные гелевые формы комплексных соединений железа и цинка при лечении

гнойных ран в первой фазе воспалительного процесса способствовали сокращению сроков заживления с 16 суток до 12 суток.

Таким образом, применение комбинированных гелей, содержащих комплексные соединения железа и нитроимидазола цинка с производными β -пиридинкарбоновой кислоты позволило получить хороший эффект при лечении гнояных раневых процессов стафилококковой этиологии, так как обеспечило высокую противомикробную активность, обезболивающий эффект и регенеративное действие, влияющие на сроки лечения ран.

Список литературы

1. Арзамасцев Е. В. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Е. В. Арзамасцев, В. П. Фисенко, Э. А. Бабаян. – М.: Ремедиум, 2000. – 115 с.
2. Беленький М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / М. Л. Беленький. – М.: Наука, 1971. – 177 с.
3. Даценко Б. М. Методические рекомендации по экспериментальному (доклиническому) изучению лекарственных препаратов для местного лечения гнояных ран / Б. М. Даценко, Н. Ф. Калининченко, В. К. Лепехин [и др.]. – М., 1995. – 45 с.
4. Игнатов Ю. Д. Методические рекомендации по экспериментальному изучению местноанестезирующих средств / Ю. Н. Васильев, В. Н. Жуков [и др.]. – М., 1990. – 49 с.
5. Кузин М. И. Хирургические болезни / под ред. М. И. Кузина. – М.: Мед. лит., 2002. – 516 с.
6. Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р. У. Хабриев. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.

Рецензенты:

Ляшев Юрий Дмитриевич, д.м.н., профессор кафедры патофизиологии Курского государственного медицинского университета, КГМУ, г. Курск.

Привалова Ирина Леонидовна, д.б.н., профессор кафедры нормальной физиологии Курского государственного медицинского университета, КГМУ, г. Курск.