

Рекомендована д.м.н., професором І.М.Риженко

УДК 615.015:615.454.122:615.262.1:615.33: 615.211

ВИВЧЕННЯ АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ НОВОЇ КОМБІНОВАНОЇ МАЗІ З АМІКАЦИНОМ

С.М.Дроговоз, І.Л.Дикий, Я.О.Бутко, А.В.Горкавчук

Національний фармацевтичний університет

Досліджена антимікробна активність нової комбінованої мазі з амікацином в умовах *in vivo* та *in vitro*. В умовах *in vitro* встановлена антимікробна та протигрибкова дія мазі з амікацином по відношенню до стафілокока, синьогнійної, сінної, кишкової паличок та грибів роду *Candida*. В умовах *in vivo* встановлено, що антимікробна активність мазі з амікацином відносно стафілокової та синьогнійної інфекції не поступається референс-препарату. Проведеними дослідженнями підтверджено, що мазь з амікацином володіє антимікробною дією.

Незважаючи на постійне удосконалення методик оперативних втручань, частота інфекційних ускладнень у хірургії складає в середньому 3-15%, а за даними окремих авторів досягає 30%. Дуже часто інфекційні ускладнення спричиняють підвищення показника післяопераційної летальності [4]. Все це свідчить про значущість проблеми підвищення ефективності лікування інфекційних ускладнень [6, 9, 10]. Тому гнійнозапальні захворювання і післяопераційні гнійні ускладнення є актуальною проблемою сучасної клінічної хірургії.

Крім того, слабким місцем антибактеріальної терапії в клінічній практиці є стійкість більшості представників ранової мікрофлори до найбільш широко вживаних антибіотиків [9, 11-14]. Необхідно також відзначити, що антибіотики і хіміопрепарати відіграють велику роль при лікуванні ранових інфекцій, але водночас зумовлюють і ряд негативних явищ (можуть викликати токсичні та алергічні реакції, навіть анафілактичний шок) [1, 7, 8]. Тому актуальним напрямом в оптимізації антибактеріальної хіміотерапії ран є розробка та впровадження нових високоефективних і безпечних хіміотерапевтичних засобів з широким спектром дії.

До того ж відомо, що при інфекційних ускладненнях ранового процесу разом із хірургічною обробкою і системною терапією важлива роль відводиться місцевому лікарському лікуванню гнійних ран [4]. У порівнянні з іншими методами лікування даний спосіб має значні переваги завдя-

ки безпосередньому лікувальному впливу на осередок інфекції [3, 5].

Ефективність місцевого лікування гнійних ран можна значно підвищити шляхом використання науково обґрунтованих багатокомпонентних мазей, розроблених з урахуванням етіології, патогенезу і фаз перебігу ранового процесу.

У зв'язку з цим ТОВ "Фармацевтична компанія "Здоров'я" (Україна, м. Харків) спільно з НФаУ була розроблена нова комбінована мазь з амікацином, до складу якої увійшли антибіотик амікацин, нестероїдний протизапальний засіб німесулід, антисептик бензалконію хлорид, місцевий анестетик лідокаїн, а також фармоутворюючі речовини ПЕО-400, 1500. Склад мазі дозволяє прогнозувати доцільність її використання для лікування гнійнозапальної фази ранового процесу.

Метою наших досліджень є вивчення антимікробної дії нової комбінованої мазі з амікацином в умовах *in vivo* та *in vitro*. Як мікробіологічна модель використаний набір піогенних грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів, які найбільш часто зустрічаються у гнійному вмісті ран.

Матеріали та методи

Антимікробну дію мазі з амікацином *in vitro* вивчали методом дифузії в агар — методом "колодязів" згідно з методичними рекомендаціями на музейних штаммах мікроорганізмів [2]. Було використано 5 тест-штамів, одержаних з ДІСК ім. Л.А.Тарасевича: золотистий стафілокок (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538), палички: кишкова (*Escherichia coli* ATCC 8739), сінна (*Bacillus subtilis* ATCC 6633), синьо-зеленого гною (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) і гриби роду *Candida albicans* 184.

Ступінь активності препарату оцінювали за діаметром затримки зони росту мікроорганізмів, які утворюються в живильних середовищах у чашках Петрі.

Вивчення антимікробної дії мазі з амікацином в умовах *in vivo* вивчали на моделі локалізованої гнійно-некротичної інфекції стафілокової і синьогнійної етіології [5].

Як референс-препарат використовували мазь левосин виробництва ХФЗ "Червона зірка" (м. Хар-

Таблиця 1

Антимікробна активність досліджуваних мазей, вивчена методом “колодязів”

Тест-штами мікроорганізмів	Зона затримки росту під впливом мазі з амікацином, мм ²	Зона затримки росту під впливом мазі левосин, мм ²
S. aureus	39,2±1,8	38,6±3,8
E. Coli	44,7±2,6	44,3±5,7
B. subtilis	36,7±1,8	40,2±4,7
P. aeruginosa	40,2±2,8*	32,8±1,3
Candida	26,2±1,4	—

Примітка: * — достовірно по відношенню до референс-препарату (p<0,05).

ків), до складу якої входить: хлорамфенікол, сульфадиметоксин, метилурацил, тримекаїн, ПЕО-400, 1500. Вибір референс-препарату був обумовлений спільністю фармакологічних ефектів (антимікробний, протизапальний, анальгезуючий), показань до застосування (використання в клініці для місцевого лікування гнійнозапальних процесів шкіри) та спектра антимікробної дії (відносно стафілокока, синьогнійної, сінної, кишкової паличок та ін.).

У досліді використано 48 білих мишей масою 17-24 г. Тварини були розділені на 2 великі групи (по 24 в кожній). В першій групі тварин моделювання гнійної рани викликали золотистим стафілококом, у другій групі — синьогнійною паличкою. У свою чергу, в кожній групі тварин підрозділяли на 3 підгрупи (по 8 тварин у кожній): дві лікованих і одну контрольну. Всім тваринам на бічній поверхні спини вистригали ділянку розміром 2x2 см². Всередину ділянки підшкірно вводили 0,2 мл 10% розчину хлористого кальцію для розвитку некрозу шкіри. Через 3 доби до центру

зони некрозу вводили першій групі 0,2 мл мікробної суспензії, яка містить 1 млрд/мл мікробних тіл культури золотистого стафілокока, другій групі — 0,2 мл мікробної суспензії, яка містить 1 млрд/мл мікробних тіл культури синьогнійної палички [5].

Через 4 дні після зараження у всіх тварин утворилися рани з вираженими ділянками некрозу і значною кількістю гнійних виділень. Лікування мазями починали після розвитку гнійно-запальних осередків у тварин (4-та доба після зараження) протягом 12 днів. Для цього один раз на добу мишам першої дослідної групи наносили мазь з амікацином, а другої — мазь левосин, мишей контрольної групи не лікували.

Для оцінки хіміотерапевтичної активності мазей враховували ряд параметрів: виживання тварин, характер і ступінь реакції в зоні некрозу, площу некрозу, дані бактеріологічного дослідження мікрофлори рани (кількісну динаміку мікробних тіл в рані (КУО)). Вимірювання даних показників проводили на 1, 3, 5, 7, 10, 12 день з початку лікування.

Таблиця 2

Ефективність досліджуваних мазей на моделі гнійнонекротичного процесу стафілококової етіології у мишей (n=8)

Дні лікування	Контрольна патологія		Мазь з амікацином		Мазь левосин	
	S ран, мм ²	КУО	S ран, мм ²	КУО	S ран, мм ²	КУО
Вихідні дані	72,4±6,4	2x10 ⁵ -10 ⁷	76,3±5,3	2x10 ⁵ -10 ⁷	70,6±6,3	2x10 ⁴ -10 ⁷
1	74,6±4,8	10 ⁵ -10 ⁸	73,3±6,3	10 ⁴ -10 ⁷	67,4±5,3	10 ⁴ -10 ⁷
3	64,4±3,3	10 ⁴ -10 ⁷	41,4±4,8 ^{**}	10 ³ -10 ⁶	46,2±3,3 ^{**}	10 ³ -10 ⁶
5	58,2±2,9	10 ⁴ -10 ⁶	27,0±3,3 ^{**}	10 ³ -10 ⁵	30,1±4,4 ^{**}	10 ³ -10 ⁵
7	39,0±3,3*	10 ³ -10 ⁵	14,4±1,9 ^{**}	10 ² -10 ⁴	19,4±2,1 ^{**}	10 ² -10 ⁴
10	20,2±4,3*	10 ³ -10 ⁴	6,7±1,5 ^{**}	10 ² -10 ³	8,8±1,9 ^{**}	10 ² -10 ³
12	13,0±2,1*	10 ² -10 ³	—	Мікроорганізми не знайдені	—	Поодинокі колонії S.aureus

Примітки:

- * — достовірно по відношенню до вихідних даних (p<0,05);
- ** — достовірно по відношенню до контрольної патології (p<0,05);
- КУО — колонієутворюючі одиниці;
- S ран — площа некротизованої ділянки шкіри, мм²;
- n — кількість тварин в експериментальних групах.

Таблиця 3

Ефективність досліджуваних мазей на моделі гнійнонекротичного процесу синьогнійної етіології у мишей (n=8)

Дні лікування	Контрольна патологія		Мазь з амікацином		Мазь левосин	
	S ран, мм ²	КУО	S ран, мм ²	КУО	S ран, мм ²	КУО
Вихідні дані	82,2±5,4	2x10 ⁵ -10 ⁷	84,5±5,3	2x10 ⁵ -10 ⁷	76,8±7,5	2x10 ⁵ -10 ⁷
1	96,8±6,3	10 ⁵ -10 ⁷	90,1±7,3	10 ⁴ -10 ⁶	89,4±6,4	10 ⁵ -10 ⁷
3	90,4±4,6	10 ⁶ -10 ⁸	58,1±4,8 ^{**} / ^{***}	10 ⁴ -10 ⁵	68,2±5,3 ^{**}	10 ⁴ -10 ⁶
5	81,2±5,3	10 ⁵ -10 ⁷	31,3±4,3 ^{**} / ^{***}	10 ³ -10 ⁵	42,6±3,8 ^{**} / ^{***}	10 ³ -10 ⁵
7	70,4±3,8	10 ⁴ -10 ⁶	11,2±1,9 ^{**} / ^{***} / ^{****}	10 ² -10 ⁴	23,8±2,9 ^{**} / ^{***}	10 ³ -10 ⁴
10	46,2±5,6 [*]	10 ³ -10 ⁴	—	Поодинокі колонії P.aeruginosa	14,8±1,9 ^{**} / ^{***}	10 ² -10 ³
12	27,5±2,9	10 ² -10 ³	—	—	2,6±0,6 ^{**} / ^{***}	Поодинокі колонії P.aeruginosa

Примітки:

1. * — достовірно по відношенню до вихідних даних (p≤0,05);
2. ** — достовірно по відношенню до контрольної патології (p≤0,05);
3. *** — достовірно по відношенню до референс-препарату (p≤0,05);
4. КУО — колонієутворюючі одиниці;
5. S ран — площа некротизованої ділянки шкіри, мм²;
6. n — кількість тварин в експериментальних групах.

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням критерію Стьюдента з вірогідністю (p≤0,05) [2].

Результати та їх обговорення

Результати дослідження антимікробної активності мазі з амікацином методом колодязів представлені в табл. 1. Дані проведених досліджень показали широкий спектр високовираженої мікробіцидної активності досліджуваного препарату.

На основі аналізу експериментальних даних, наведених у табл. 1, слід зазначити високу мікробіцидну активність мазі з амікацином по відношенню до синьогнійної інфекції *P. aeruginosa* зона затримки росту складає 40,2 мм², а до патогенних грибів *Candida* — 26,2 мм², які часто ускладнюють патогенез ранового інфекційного процесу, особливо в умовах терапії антибіотиками. Дані показники були достовірно вищі, ніж у референс-препарату. За антиешерихіозною (*E. coli*) і антистафілококовою (*S. aureus*) активністю мазь з амікацином не поступалася референс-препарату: у мазі з амікацином зона затримки росту склала 44,7 і 39,2 мм², тоді як у мазі левосин — 44,3 і 38,6 мм², відповідно.

Результати вивчення хіміотерапевтичної активності мазі з амікацином на моделі гнійнонекротичного процесу у мишей представлені у табл. 2 і 3.

Вивчення антимікробної дії мазі з амікацином на даній моделі показало, що на 1-у добу після інфікування вогнищ некрозу в лікованих і контрольних групах рівень мікробного обсіменіння знаходився в межах 10⁴-10⁸ КУО.

Результати бактеріологічних досліджень (табл. 2) свідчать про те, що кількість висіяних мікроор-

ганізмів у тварин в контрольній групі на 1-2 порядки була вищою (10⁵-10⁸ КУО), ніж у групах, лікованих маззю з амікацином і маззю левосин (10⁴-10⁷ КУО).

Аналізуючи одержані результати, слід зазначити, що за антистафілококовою активністю мазь з амікацином не поступалася референс-препарату: так на 5-у добу лікування рівень бактерійного обсіменіння був нижчий за критичний рівень (10⁵ КУО) і склав 10³-10⁵ КУО в групах, лікованих маззю з амікацином і маззю левосин, а площа некротичної ділянки шкіри зменшилася в 2,8 і 2,4 рази, відповідно, в порівнянні з початковими даними. На 12-у добу в групі тварин, лікованих маззю з амікацином, спостерігалася відсутність колоній мікроорганізмів і епітелізація ран (у 100% тварин в даній групі), у групі тварин, лікованих маззю левосин — поодинокі колонії *S.aureus* і епітелізація ран (у 87,5% тварин у даній групі).

Таким чином, мазь з амікацином на моделі гнійно-некротичного процесу стафілококової етіології проявила антимікробну активність на рівні референс-препарату.

Результати, наведені в табл. 3, свідчать про виражену антисиньогнійну активність мазі з амікацином в порівнянні з референс-препаратом. Так, у групі тварин, лікованих маззю з амікацином, рівень бактеріального обсіменіння в некротизованих ділянках був нижчий за критичний рівень (10⁵ КУО) вже на 3-ю добу лікування, а у групі тварин, лікованих референс-препаратом, тільки на 5-у добу. Грануляція та епітелізація, а також повне очищення від мікроорганізмів некротизованої ділянки шкіри у тварин, лікованих маззю з

амікацином, спостерігалось на 10-у добу лікування, а в групі тварин, лікованих референс-препаратом, такі зміни спостерігалися тільки у 25% тварин у групі на 12-ту добу лікування.

Таким чином, аналіз одержаних даних дозволяє зробити висновок про виражену антисиньогнійну та антистафілококову активність мазі з амікацином, що вивчається, в умовах *in vivo*. Крім того, загоєння ран, інфікованих синьогнійною паличкою, відбувалося швидше, ніж із стафілоковою мікрофлорою. Так, на 10-ту добу лікування ран маззю з амікацином спостерігалась відсутність бактерійного обсіменіння синьогнійною інфекцією і 100% епітелізація некротизованої ділянки шкіри, тоді як у ранах зі стафілоковою етіологією такі зміни спостерігалися лише на 12-ту добу.

ВИСНОВКИ

1. У ході проведення доклінічного дослідження встановлено спектр мікробіцидної активності мазі з амікацином. Показано, що як і субстанція розроблений лікарський препарат володіє широким спектром антибактеріальної активності, яка поєднується з фунгіцидною дією на гриби роду

Candida. У зв'язку з вибірковою антимікробною дією мазь з амікацином не володіє дизбіотичними властивостями, а поєднання антибактеріальної і антифунгальної активності дозволяє прогнозувати антимікстову активність препарату.

2. В умовах моделювання локалізованої гнійнонекротичної інфекції на білих мишах, відтвореної золотистим стафілакоком і синьогнійною паличкою, підтверджена висока хіміотерапевтична активність мазі з амікацином у плані санації вогнища некрозу і вираженої репарації відтвореного некрозу.

3. Мазь з амікацином за рівнем та спектром антимікробної активності в цілому наближена до референс-препарату, проте перевищує його за дією на синьогнійну паличку та наявністю супутньої протигрибкової активності.

4. У зв'язку з одержаними результатами слід вважати перспективними фармакологічні дослідження препарату, що розробляється.

5. Проведені дослідження доводять доцільність використання мазі з амікацином у гнійнозапальній фазі ранового процесу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гладух Е.В., Стрілець О.П. // *Фармац. журн.* — 2002. — №4. — С. 90-93.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації. / Під ред. О.В. Стефанова. — К., 2001. — 527 с.
3. Ковальов В.М., Дикий І.Л., Чуєшов В.І. та ін. // *Вісник фармації.* — 2000. — №3 (23). — С. 29-32.
4. Современное медикаментозное лечение ран (Ведомственная инструкция). — К., 2002. — 39 с.
5. Яковлева Л.В., Кальф-Каліф С.С., Ткачова О.В., Шевельова Н.Є. // *Фармакол. вісник.* — 1999. — №3. — С. 17-20.
6. Яковлева Л.В., Ткачова О.В., Фаді Алі Саллуб // *Клінічна фармація.* — 2005. — Т. 9, №2. — С. 57-61.
7. Challenges to epidemiology in changing Europe: The newsletter of the International Center for Studies and Research in Biomedicine // *Eur. Epimarker.* — 2001. — Vol. 3, №4. — P. 1-7.
8. Chandrasekar P.H. & Arnow P.M. // *Annals of Pharmacotherapy.* — 2000. — Vol. 34, №12. — P. 989-995.
9. Del Favero A., Menichetti F., Martino P. et al. // *Clin. Infect. Dis.* — 2001. — Vol. 33, №11. — P. 1295-301.
10. Feld R., De Pauw B., Berman S., Keating A. & Ho W. // *J. of Clin. Oncol.* — 2000. — Vol. 18, №4 — P. 3690-3698.
11. Khan M.R., Kihara M., Omoloso A.D. // *Fitoterapia.* — 2000. — Vol. 71, №11. — P. 72-74.
12. Sung L., Dupuis L.L., Bliss B. et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* — 2003. — Vol. 95, №24. — P. 1869-1877.
13. *The United States Pharmacopeia. The National Formulary (Pharmaceutical Dosage Form).* — USP — 23. — NF 18. — 1995. — P. 1949-1999.
14. Wang F.D., Liu C.Y., Hsu H.C. et al. // *Chemotherapy.* — 1999. — Vol. 45, №17. — P. 370-379.

УДК 615.015:615.454.122:615.262.1:615.33:615.211

ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ НОВОЙ КОМБИНИРОВАННОЙ МАЗИ С АМИКАЦИНОМ
С.М.Дроговоз, И.Л.Дикий, Я.А.Бутко, А.В.Горкавчук

Исследована антимикробная активность новой комбинированной мази с амикацином в условиях *in vivo* и *in vitro*. В условиях *in vitro* установлено противомикробное и противогрибковое действие мази с амикацином по отношению к стафилококку, синегнойной, сенной, кишечной палочкам и грибам рода *Candida*. В условиях *in vivo* установлено, что антимикробная активность мази с амикацином в отношении стафилококковой и синегнойной инфекции не уступает референс-препарату. В ходе проведенных исследований доказано, что мазь с амикацином обладает противомикробным действием.

UDC 615.015:615.454.122:615.262.1:615.33:615.211

THE INVESTIGATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF A NEW COMBINED OINTMENT WITH AMICACINE
S.M.Drogovoz, I.L.Dikiy, Ya.A.Butko, A.V.Gorkavchuk

The antimicrobial activity of a new combined ointment with Amicacine (in vitro and in vivo) has been investigated. It has been found that in vitro ointment with Amicacine has antimicrobial and antifungal effect to staphylococcus, blue pus bacillus, grass bacillus, colon bacillus and *Candida*. In vivo the antimicrobial activity of the ointment with Amicacine has been shown to be the same as a reference drug to staphylococcal and pseudomonal infections. It has been proven in the experiments that the ointment with Amicacine possesses the antimicrobial effect.