

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ
МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І.І. МЕЧНИКОВА

ХОЛБАБАЄВА Вікторія Олександрівна

УДК 615.454.1+615.33: 616-001.17- 081 616-092

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ
МАЗІ З ОФЛОКСАЦИНОМ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ОПІКІВ,
ІНФІКОВАНИХ PSEUDOMONAS AERUGINOSA

14.02.05. - мікробіологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття наукового ступеню
кандидата медичних наук

Харків - 1997



00743494 (V)

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Харківському державному університеті МОЗ України.

Науковий керівник:

академік АН вищої школи України, Української АН
 Національного прогресу, Міжнародної академії комп'ютерних
 наук і систем, Нью-Йоркської академії наук,
 Заслужений працівник вищої школи України, професор
 Анатолій Якович Циганенко
 Харківський державний медичний університет,
 ректор, зав. кафедрою мікробіології, імунології та
 вірусології.

Офіційні опоненти:

доктор мед. наук, професор Надтока Валентина Луківна
 ХНДІМІ ім. І.І. Мечникова, зав. лабораторією протимікробних
 засобів

доктор фарм. наук, лауреат Державної премії СРСР
 Краснопілський Юрій Михайлович
 Харківське підприємство по виробництву імуно-біологічних
 препаратів "БІОЛЕК", зам. директора

Провідна установа:

МОЗ України, Українська фармацевтична академія,
 кафедра мікробіології,
 м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

Захист дисертації відбудеться "03" березня 1998 р.
 о 11 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради
 Д 02.41.01. при Харківському науково-дослідному інституті
 мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова за
 адресою: ЗІО057, м. Харків, МСП, вул. Пушкінська, 14.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Хар-
 ківського НДІ мікробіології та імунології ім.І.І. Мечникова
 (м. Харків, МСП, вул. Пушкінська, 14.)

Автореферат розіслано "03" лютого 1998 р.

Вчений секретар спеціалізованої ради,

доктор медичних наук

Т.І. Коляда

Актуальність проблеми. Гнійно-септичні інфекції (ГСІ) посідають провідне місце в структурі сучасних шпитальних захворювань (Венцел Р.П., 1990; Neely A.N. etc., 1991; Zang Y.P., 1991). Боротьба з інфекційними ускладненнями в різних галузях медицини є дуже складною, внаслідок змін в процесі лікування видового складу раневих мікробних асоціацій (Whaat P.F. etc., 1990), колонізації ран циркулюючими в стаціонарах штамми з багатомітністю до хімотерапевтичних препаратів (Nakhla L.S., Sanders R., 1991), на фоні послабленої імунологічної реактивності організму і збільшення алергічних реакцій (Кузін М.І., Костюченко Б.М., 1990).

Частково, в комбустиології серйозною проблемою являється лікування опіків, інфікованих штамми *P. aeruginosa*, клінічні ізольовані якої більше ніж у 90 % випадках характеризуються полірезистентністю до більшості традиційних антибіотиків (Ashikawa K., Yuasa H., 1991; Bai G., 1991; Wang C.D. etc., 1991). Процес запалення в рані через неадекватність призначеної антибіотикотерапії може прогресувати і призводити до генералізації інфекції (Беляков В.Д. та ін., 1990; Мейхолл К.Г., 1990). Гнійно-септичні ускладнення у хворих із опіками, викликаними *P. aeruginosa* в 50 - 90 % випадках закінчуються смертю (Xu W.S., 1990).

Тому актуальним завданням є розробка і удосконалення методів лікування ран з допомогою нових лікарських засобів, ефективних у відношенні шпитальних штамів бактерій, в тому числі, *P. aeruginosa*.

Перспективними хімотерапевтичними препаратами є антибіотики фторхінолонового ряду, що володіють антибактеріальною активністю у відношенні широкого спектру грамотрибних бактерій та їх шпитальних штамів з вираженою поліантибіотикорезистентністю (Яковлев В.П. та ін., 1992; Нью Р.С., 1993; Довідник ВІДАЛЬ, 1996). Відсутність у бактерій механізмів розвитку стійкості, зв'язаних з ферментативним інактивуванням фторхінолонів і перенесенням R-плазмід, сприяє тому, що в процесі лікування у більшості видів резистентність до цих препаратів не розвивається, або розвивається дуже повільно (Siporin C. etc., 1990; Фадеева Н.І. та ін., 1993).

Не дивлячись на це, в літературі відмічено випадки виділення із гнійних ран хворих, які піддавалися системному лікуванню фторхінолонами, штамів *P. aeruginosa* з низькою чутливістю до ципрофлоксацину та офлоксацину (Большакова А.В., Богомолова Н.С., 1991; Даценко Б.М., 1995).

Вищезазначене свідчить про актуальність досліджень по експериментальному обґрунтуванню складу нових мазей на гідрофільних основах, які містять офлоксацин, що були б ефективними при лікуванні опіків, інфікованих шпитальними штамми *P. aeruginosa* і супутньої аеробної та факультативно-анаеробної мікрофлори, і не викликали в процесі лікування розвитку у бактеріальної флори стійкості до фторхінолону.

Мета і задачі дослідження.

Метою роботи була розробка нових підходів у лікуванні синегнійної інфекції на підставі теоретичного та експериментального обґрунтування переваг місцевої терапії опіків, інфікованих *Pseudomonas aeruginosa*, мазю на гідрофільній основі з офлоксацином.

Для досягнення цієї мети були поставлені такі завдання:

- дослідити етіологічну структуру гнійно-септичних інфекцій у хворих опікового відділення багатопрофільного стаціонару і виявити роль синегнійної палички, як збудника інфекційних ускладнень;
- дослідити чутливість до субстанції офлоксацину, які виробляють різні зарубіжні фірми і ресинтезованого в Україні ІОХ, стандартних і шпитальних штамів бактерій (аеробів і факультативних анаеробів) в порівнянні з іншими антибіотиками, що широко застосовуються в клініках;
- *in vitro* дослідити вплив на антибактеріальну дію офлоксацину типу і складу мазевих основ;
- дослідити *in vitro* антибактеріальну активність розробленої мазі з офлоксацином у відношенні еталонних і клінічних штамів *P. aeruginosa* і супутньої аеробної та факультативно-анаеробної мікрофлори опікової рани;
- вивчити терапевтичну ефективність мазі з офлоксацином на експериментальній моделі синегнійної опікової інфекції у мишей;
- дослідити деякі біофармацевтичні властивості мазі з офлоксацином;

- виявити вплив мазі з офлоксацином на клітковий та гуморальний імунітет експериментальних тварин, вивчити місцевоподразнюючі та алергічні властивості препарату;

- дослідити вплив деяких допоміжних речовин на розвиток стійкості до офлоксацину у стандартного штаму *P. aeruginosa*;

- подати звіти про доклінічне вивчення мазі з офлоксацином в Фармакологічний комітет МОЗ України, розробити інструкції щодо її клінічного вивчення та застосуванню в медичній практиці.

Наукова новизна одержаних результатів.

Вперше у вітчизняній та зарубіжній практиці теоретичними й експериментальними дослідженнями обґрунтовано склад комбінованої мазі з офлоксацином і місцевим анестетиком на гідрофільній водорозстворючій основі (спільно з ДНЦЛЗ).

Досліджена антибактеріальна активність субстанції офлоксацину і розробленої комбінованої мазі з офлоксацином в дослідках *in vitro* та *in vivo* в порівнянні з препаратами аналогічного призначення і вперше науково обґрунтована доцільність застосування офлоксацину для місцевого лікування опікових ран, інфікованих *P. aeruginosa*, в складі мазі на гідрофільній основі.

Вперше встановлено, що при місцевому застосуванні мазі з офлоксацином можна попередити розвиток до нього резистентності шляхом утворення бактерицидних концентрацій офлоксацину в тканинах рани і комбінацій офлоксацину з деякими допоміжними речовинами (катионними поверхнево-активними речовинами (ПАР) і комплексонами).

Практичне значення одержаних результатів.

Розроблено дві комбіновані мазі з офлоксацином "Офлокаїн" та "Офлотримол", які складаються, відповідно: із комбінації офлоксацину з тримекаїном та лідокаїном на гідрофільній гіперосмолярній основі. Фармакологічний комітет МОЗ України дозволив клінічне вивчення (протокол № 9 від 30. ІІ. 95 р.) та, на основі позитивних результатів клінічних досліджень, рекомендував дозволити медичне застосування зазначених препаратів (протокол № I від 2. 02. 96 р.).

Документація на антибіотик офлоксацин, як антибактеріальний засіб, що виробляє фірма "Ranbaxy"

(Індія), зареєстрована Фармакопійним комітетом МОЗ України (ТФС 42У-І/4-28І-96); затверджена ТФС на мазь "Офлокаїн" із цим антибіотиком (42У-І/37-4І9-97).

На мазі "Офлокаїн" та "Офлотримол" розроблені інструкції щодо застосування на медичній практиці, які затверджені Президією Фармакологічного комітету МОЗ України (протокол № 4 від 25. 04. 96 р.).

Виробництво мазі "Офлокаїн" організовується в 1997 році на АС "Фармацевтична фірма "Дарниця".

Особистий внесок здобувача.

В процесі добування наукових результатів, викладених в дисертації: вивчення етіологічної структури ГСІ, антибактеріальних властивостей субстанцій офлоксацину, мазі з офлоксацином та препаратів аналогічного призначення, терапевтичної ефективності мазі з офлоксацином на експериментальних моделях, впливу деяких допоміжних речовин на розвиток резистентності до офлоксацину у *P. aeruginosa*; статистична обробка матеріалу і оформлення роботи виконані автором самостійно.

Основні положення, котрі виносяться на захист.

1. Місцеве лікування *Pseudomonas*-інфекції опікових ран гідрофільними мазями з офлоксацином "Офлотримол" і "Офлокаїн" має теоретично і експериментально обґрунтовані переваги перед лікуванням відомими препаратами аналогічного призначення. Місцеве терапевтичне застосування мазей з офлоксацином сприяє швидкій елімінації *P. aeruginosa* з поверхні опіку, що перешкоджає розвитку синегнійного сепсису і скорочує термін переходу фази запалення в фазу репарації.

2. Гідрофільна основа розроблених мазей з офлоксацином підсилює антибактеріальні властивості офлоксацину і забезпечує утворення в рані бактерицидних концентрацій офлоксацину по відношенню до досліджених штамів *P. aeruginosa* і супутньої аеробної та факультативно-анаеробної мікрофлори опікової поверхні.

3. Застосування мазей з офлоксацином не викликає у деяких видів експериментальних тварин змін імунологічного статусу, алергічних реакцій і місцевоподразнюючої дії.

4. Додавання іоногенних ПАР в суббактеріостатичних

концентраціях до складу розроблених мазей підсилює антимікробні властивості офлоксацину та перешкоджує підвищенню рівня стійкості *P. aeruginosa* до офлоксацину.

Апробація результатів дисертації.

Основні положення дисертаційної роботи були викладені на конференції молодих вчених та спеціалістів ХДМУ (Харків, 1996), на міжкафедральному засіданні ХДМУ (Харків, 1997).

Мазі з офлоксацином успішно пройшли клінічні випробування на кафедрі лицевої хірургії ХДМУ, на кафедрі хірургії ХІУЛ, в Київському інституті клінічної та експериментальної хірургії АМН України.

Обсяг і структура дисертації.

Робота складається із вступу, огляду літератури, 6 частин власних досліджень, заключної частини, висновків. Дисертація викладена на 112 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 26 таблицями і 5 малюнками. Список використаних джерел включає 140 російськомовних та 147 англійськомовних публікацій.

Публікації.

По темі дисертації опубліковано 7 друкованих робіт.

ЗМІСТ РОБОТИ

Об'єкти і методи досліджень

Головними об'єктами досліджень були:

1. Субстанції антибактеріальних препаратів, поверхнево-активних речовин, компоненти маzewої основи.

2. Препарати у вигляді мазі, призначені для місцевого лікування опіків, інфікованих синегнійною паличкою, котрі були приготовлені на гідрофільних основах.

В роботі були використані такі методи досліджень:

1. Мікробіологічні методи. Оглянуто 115 хворих із раневою опіковою інфекцією. Виділені мікроорганізми ідентифіковані у відповідності з Наказом МОЗ СРСР № 250 від 13. 12. 1975 р., № 535 від 22. 04. 1985 р. і методичними рекомендаціями (Харків, 1991).

Чутливість мікроорганізмів до антибіотиків та хіміопрепаратів визначали у відповідності з Наказом МОЗ СРСР №

250 від ІЗ. ІЗ. 1975 р., № 535 від 22. 04. 1985 р. і методичними рекомендаціями (Харків, 1991).

Антибактеріальну активність офлоксацину і допоміжних речовин досліджували у відношенні ІЗІ клінічного й еталонного штаму тест-культур мікробів *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* I10, *Proteus vulgaris* XZ 4636, одержаних із ДНДІСК ім. Л.О. Тарасевича.

Оцінку антибактеріальних ефектів мазевих композицій із офлоксацином проводили методом дифузії в агар в двох шарах поживного середовища у відповідності із методичними рекомендаціями (Харків, 1991).

Дослідження по вивченню розвитку стійкості до офлоксацину у штамів *P. aeruginosa* проводили за методом Ланчїні Д., Паренті Ф. (1985) та Felmingham D. і співавт. (1988). Стійкі до офлоксацину мутанти синегнійної палички одержували методом одноступеневого й багатоступеневого добору на агарі Хоттингера і м'ясо-пептонному бульйоні.

Вплив ЦАР на розвиток у *P. aeruginosa* стійкості до офлоксацину проводили із еталонним штамом ATCC 27853 на рідкому поживному середовищі. Результати селекції оцінювали, реєструючи підвищення початкових значень МПК та МБК.

2. Імунологічні методи. Дослідження впливу розробленого препарату на показники імунітету здорових мишей вивчали у відповідь на одноразове внутрішньочеревне введення тваринам 2×10^8 еритроцитів барана (ЕБ), у відповідності із методичними указівками (Москва, 1984).

Реакцію "трансплантат проти хазяїна" (РТПХ) поновлювали за методом В. Тессенов (1979). Визначення титрів сироваточних гемаглютининів проводили по Зиглю Е. (1979). Реакцію гіперчутливості уповільненого типу (ГУТ) відновлювали, використовуючи методику К. Kitamura (1980). Визначення кількості антитілоутворюючих кліток (АУК) в селезінці проводили з допомогою методу локального гемолізу еритроцитів в гелі агарози.

3. Експериментальні моделі інфекційних захворювань. Для дослідження терапевтичної ефективності мазі, яка має в складі офлоксацин, використовували експериментальну модель синегнійної опікової інфекції (Чантурія Ц. К., 1982;

Мінухін В. В. та ін., 1985).

В експерименті із мишами одержали опіки 10% поверхні тіла IIIA - IIIБ ступеню асептичні та, інфіковані штамом *P. aeruginosa* ATCC 27853, в дозі $1,02 \times 10^8$ м.т./мл, відповідної LD_{50} для застосування на шкірі. Лікування експериментальних опіків антибактеріальними мазями починали через 24 години після опіку чи опіку і зараження. Один раз за добу визначали площу опікової поверхні (Kaiser W. etc., 1984), загальний мікробний пейзаж і висіювання із ран *P. aeruginosa* за Мороз А.Ф. і співавт., 1986 р. Оцінювали клінічний стан тварин і летальність серед мишей.

4. Алергологічні методи. Алергізуючі дії вивчали у відповідності із методичними рекомендаціями (Москва, 1988). Сенсibilізацію морських свинок проводили шляхом повторних аплікацій мазі з офлоксацином на депіліровану ділянку шкіри (Бережна Н.М., Бобкова Л.П., 1986). Перше тестування проводили після 10 аплікацій, друге - після 20 аплікацій.

Реакцію непрямой дегрануляції тучних кліток (РНДТБ) складала на тканевих базофілах, одержаних від пацюків лінії Wistar за методом Shwartz G., Vardinon N. (1966) і Алексеевої О.Г., Дуєвої Л.А. (1978). Ступінь дегрануляції визначали морфологічно. Вивчення активної шкіряної анафілаксії (АША) проводили за Черноусовим А. Д., 1987 р. Виразність реакції агломерації лейкоцитів (РАЛ) визначали за Алексеевою О.Г., Дуєвою Л.А., 1978 р. Реакцію імунних комплексів вивчали по Зиглю Е., 1987 р. Кількість утворених комплексів оцінювали фотометрично (Фрімель Г., 1987) за допомогою ФЕК-56. Кон'юнктивальне випробування проводили на тваринах, сенсibilізованих шкіряними аплікаціями мазі з офлоксацином. Клінічний аналіз крові проводили за загальноприйнятими методиками (Меншиков В.В. та ін., 1987). В процесі вивчення алергічної реактивності експериментальних тварин піддавали щоденним клінічним спостереженням.

5. Біофармацевтичні методи. Вміст офлоксацину в системному кровотоці і тканинах шкіри експериментальних тварин визначали за методом Lidia J., Nottarani, 1988 р. із використанням високоефективної рідинної хроматографії. Розрахунки фармакокінетичних параметрів проводили за Соловйовим В.Н. та співавт. (1980) і Фіровим А.А. (1984).

6. Статистичні методи. Всі цифрові результати опрацьовані методом варіаційної статистики (Поллард Д, 1982), достовірність одержаних результатів оцінена методом Ст'юдента із застосуванням програм, розроблених для комп'ютерів типу IBM PC/AT.

7. Кількісні характеристики, загальні принципи і методи роботи із лабораторними тваринами. Всього для дисертаційної роботи було використано 280 мишей, 50 морських свинок, 50 щурів та 16 кролів.

Під час роботи з лабораторними тваринами користувались "Європейською конвенцією захисту хребетних тварин, котрі використовуються із експериментальними та іншими науковими цілями (Страсбург, 18.03.86)", Наказом Мінздраву УРСР № 32 від 22 лютого 1988 р. та ін.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДІВ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Етіологічна структура раневої опікової інфекції і чутливість виділеної мікрофлори до антибіотиків

У хворих із глибокими (III А - III В ступеню) та інфікованими опіками, що знаходились на лікуванні в багатoproфільному хірургічному стаціонарі було виділено 126 штамів умовно-патогенних мікроорганізмів, ідентифікованих як *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*

В загальній структурі раневих опікових інфекцій нагноєння в 65,9 % викликалися грамнегативною флорою, стафілококова інфекція ран відмічена в 34,1 %. Етіологічне значення окремих грамнегативних бактерій в інфікуванні ран неоднозначне. *P. aeruginosa* виділена нами в 21,5 % випадках, *Proteus spp.* - в 28 %, *E. coli.* - в 12 % и *Klebsiella spp.* - в 4,7 %.

В 51,3 % випадках виділені бактерії виявляли стійкість до декількох груп антибактеріальних препаратів: *S. aureus* - в 75 %, *E. coli* - в 43 %, *Proteus spp.* - 91%. Найбільш високий рівень резистентності серед клінічних штамів *P. aeruginosa*. Полірезистентні варіанти збудника переважають в

97,7 %. Виражена резистентність *P. aeruginosa* до напівсинтетичних пеніцилінів (100%) та карбеніциліну (93,4%), поліміксину (86,7%), левоміцетину (100%) та аміноглікозидам, а також, і до гентаміцину (80%).

В процесі перебування хворих на стаціонарі і лікування антибактеріальними препаратами спостерігається колонізація опікової поверхні полірезистентною мікрофлорою. На випадок розвитку *Pseudomonas*-інфекції застосування вищеуказаних антимікробних засобів не забезпечує достатнього терапевтичного ефекту. Таким чином, пошук нових методів лікування синегнійної інфекції залишається актуальним завданням сучасної медицини.

Дослідження антибактеріальних властивостей офлоксацину

Ін'єкційна форма офлоксацину поставляється на світовий ринок медичної продукції фірмами-виробниками "Hoechst", "Ranbaxy", "Mustafa Nevzat" (Довідник ВІДАЛЬ, 1997).

У відповідності з Постановою Кабінету Міністрів України № 573 в Інституті органічної хімії (м. Київ) ресинтезований офлоксацин, дозволений Фармакологічним комітетом МОЗ України для клінічного вивчення у вигляді мазі на гідрофільній основі в комбінації з місцевим анестетиком (протокол № 9 від 30. II. 95 р.).

Нами встановлено, що спектри антимікробної дії і показники антибактеріальної активності ресинтезованого препарату та препаратів фірм "Ranbaxy" (Індія) і "Hoechst" (Німеччина), досліджені *in vitro* у відношенні ІЗІ клінічного та еталонного штамів бактерій співпадають.

Офлоксацин є високоефективним антибактеріальним препаратом у відношенні стандартних та клінічних штамів *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., одержаних від хворих із ГСІ в клініках України. До офлоксацину чутливі 100% досліджених клінічних ізолятів *S. aureus* і *E. coli*, 50% *Proteus* spp. Помірно чутливі до препарату 80% штамів *P. aeruginosa*, решта ізоляти протея, всі - *Klebsiella*. Антипсевдомонадний ефект офлоксацину перевершує можливості левоміцетину в І9 і поліміксину - в 8 разів. Показники антимікробної активності офлоксацину

наведено в табл. I.

Таблиця I

Мінімальна концентрація офлоксацину, необхідна для пригнічення 50 % і 90 % штамів бактерій, що виділені від хворих із раневою опіковою інфекцією ($M \pm m$), мкг/мл

Штам бактерій	МПК 50	МПК 90
<i>P. aeruginosa</i>	7,7 \pm 1,0	14,5 \pm 3,2
<i>S. aureus</i>	0,9 \pm 0,1	1,4 \pm 0,3
<i>Proteus spp.</i>	1,7 \pm 0,4	5,3 \pm 0,8
<i>E. coli</i>	0,9 \pm 0,1	2,1 \pm 0,4
<i>Klebsiella spp.</i>	3,6 \pm 1,0	4,0 \pm 1,2

Експериментальне обґрунтування складу мазі з офлоксацином

Серед факторів, що впливають на активність хіміотерапевтичних речовин у складі мазей для лікування гнійних ран, найбільшу увагу приділяють типу основи (Даченко Б.М., 1995).

Нами експериментально доведено, що гідрофобна ланолін-вазелинова основа інгібує дифузію офлоксацину в середовище, таким чином, ріст еталонних штамів *P. aeruginosa*, *P. vulgaris* і *K. pneumoniae* не пригнічується, а штами *S. aureus* і *E. coli* стають малочутливими до такого препарату (діаметр зон затримки росту (D зон) < 13 мм). Помірною чутливістю (D зон 23 \pm 0,1 мм) до офлоксацину у складі мазі на емульсійній основі I-го роду володіє *P. aeruginosa*.

Розроблена мазь з офлоксацином готується на водорозтворчій мазевій основі, котра складається з комбінації осмотично активних речовин: поліетиленоксиду-400, 1,2-пропіленгліколя і проксанолу 268, що сприяє підвищенню антибактеріальної активності антибіотика, забезпечує високу

антибактеріальну ефективність мазі (D зон >30 мм) у відношенні всіх вивчених штамів, за рахунок більш інтенсивного вивільнення офлоксацину із основи та його дифузії в живильне середовище (табл. 2).

Таблиця 2

Антимікробна активність мазі з офлоксацином ($M \pm m$), мм

Штам бактерій	Діаметри зон затримки росту		
	1	2	3
<i>P. aeruginosa</i>	30,1 \pm 0,1	28,5 \pm 2,9*	27,8 \pm 2,6**
<i>S. aureus</i>	33,8 \pm 0,1	29,6 \pm 1,1*	29,3 \pm 2,3**
<i>Proteus spp.</i>	33,1 \pm 0,1	28,8 \pm 1,2*	27,7 \pm 1,0**
<i>E. coli</i>	34,1 \pm 0,1	28,9 \pm 2,3*	28,1 \pm 2,0**
<i>Klebsiella spp.</i>	33,1 \pm 0,1	27,0 \pm 3,6*	26,5 \pm 4,3**

Примітки:

1 - активність у відношенні еталонних штамів бактерій;

2 - активність у відношенні клінічних штамів;

3 - активність у відношенні полірезистентних штамів;

* - вірогідність показника у порівнянні із 1 групою;

** - вірогідність показника у порівнянні із 2 групою.

Результати досліджень *in vitro* свідчать, що місцеві анестетики тримекаїн и лідокаїн у складі мазей з офлоксацином не змінюють антимікробних властивостей офлоксацину ($p < 0,001$).

Одержані по ходу вищевикладеної експериментальної частини дослідів результати дозволили обґрунтувати склади мазей з офлоксацином "Офлокаїн" та "Офлотримол".

Експериментальне вивчення мазей з офлоксацином

Антибактеріальні властивості розроблених мазей ми порівняли *in vitro* із бактеріологічною ефективністю препаратів, що застосовуються при лікуванні ран: мазі "Лєво-

син", "Лініменту поліміксину М сульфату", "Мазі гентаміцинової", "Мазі нітацид" та "Мазі мірамістину 0,5 %".

Мазі з офлоксацином мають виражену антибактеріальну дію на стандартні і, виділені від хворих із опіками, штами вищеуказаних бактерій (D зон, відповідно, > 30 мм і > 27 мм). Антибактеріальний ефект мазей, що порівнюються у відношенні клінічних ізолятів бактерій достовірно ($p < 0,001$) нижчий, ніж у мазей з офлоксацином.

Мазі з офлоксацином являються активними антипсевдомо-надними препаратами. Діаметри зон затримки росту 27 клінічних штамів *P. aeruginosa* становили $28,5 \pm 2,9$ мм, штаму ATCC 27853 - $30,1 \pm 0,1$ мм. Аналогічні показники мазі "Левосин", "Лініменту поліміксину М сульфату", "Мазі гентаміцинової", "Мазі нітацид" та "Мазі мірамістину 0,5 %" у відношенні стандартного штаму *P. aeruginosa* були вірогідно ($p < 0,01$) нижчі, складаючи, відповідно, $19,8 \pm 0,1$ мм, $23,2 \pm 0,1$ мм, $27,1 \pm 0,1$ мм, $26,8 \pm 0,1$ мм та $24,1 \pm 0,1$ мм.

При лікуванні мазями з офлоксацином інфікованих *P. aeruginosa* експериментальних опіків доведено, що вже після одноразового нанесення цих препаратів у 40 % тварин досягалась елімінація збудника із поверхні ран, а повна санація ран наступала на 3 - 4-й день експерименту в усіх тварин дослідної групи.

Мазі "Левосин" та "Лінімент поліміксину М сульфату" при одноразовому застосуванні бактерицидною активністю не володіють, звільнення ран від *P. aeruginosa* спостерігалось у 50% тварин на 8-му добу експерименту. Повна елімінація *P. aeruginosa* із поверхні опікових ран у тварин, яких лікували маззю "Левосин", проходила на 12-у добу. Одиначні колонії збудника до 15 діб висівались із поверхні ран 30 % тварин, яким аплікували "Лінімент поліміксину М сульфату", а повна санація ран наступала на 18-у добу. В контролі *P. aeruginosa* висівалась у 100% випадків протягом всього експерименту.

У тварин із синегнійною інфекцією в контрольній групі загинуло 80% мишей; в групі, що лікували маззю "Левосин" - 33%, "Лініментом поліміксину М сульфату" - 46%. В групі, де лікування проводилось мазями із офлоксацином, всі тварини

залишилися живими.

При лікуванні опіків, інфікованих синегнійною паличкою, мазями з офлоксацином різниця в швидкості репарації раневої поверхні у тварин, в порівнянні із контролем, стає очевидною вже 6-ї доби, а із групами тварин, яким терапія проводилась антибактеріальною маззю "Левосин" та "Лініментом поліміксину М сульфату" - тільки на 8-у добу спостережень. В групі мишей, яких лікували маззю "Левосин", площа опіків зменшувалась на 12-й, а "Лініментом поліміксина М сульфата" - на 15-й день терапії. На 18-у добу площа репарації у тварин з аплікаціями мазей з офлоксацином становила - 67%, достовірно ($p < 0,1$) перевищуючи показники заживання при лікуванні маззю "Левосин" та "Лініментом поліміксину М сульфату".

Репаративні процеси при лікуванні мазями з офлоксацином порівняно з контролем проходять значно швидше ($p < 0,01$). Певне скорочення площі опікової раневої поверхні у тварин, яких лікували цими мазями, наступає на 12-у добу (в контролі - на 18-у добу).

Таким чином, мазі "Офлокаїн" та "Офлотримол" є ефективними засобами для лікування *Pseudomonas*-інфекції опікових ран, бо сприяючи елімінації збудника із поверхні опіку вже при 3-4-х разових аплікаціях, вони скорочують термін переходу фази запалення в фазу репарації на 5 - 6 діб і мають відчутні переваги перед відомими препаратами аналогічного призначення.

Нами досліджено розвиток стійкості до офлоксацину у штамів *P. aeruginosa* в умовах тривалого (25 - 30 пасажів) культивування в середовищах, які складаються із цього антибіотику в різних концентраціях. При введенні в середовища суббактерицидних концентрацій офлоксацину стійкість до хінолону у штамів *P. aeruginosa* підвищується в 16 - 33 рази. При культивуванні штама *P. aeruginosa* ATCC 27853 в середовищах, що складаються із офлоксацину в концентрації, що в 10, 20 і 30 раз перевищують МБК для цього штаму, стійкість до офлоксацину не розвивається.

Результати дослідів свідчать про можливість застосування мазей "Офлокаїн" та "Офлотримол", котрі мають антибіотик в концентрації, що у 32 рази перевищує його мінімальну

бактерицидну концентрацію, визначену для стандартного штаму *P. aeruginosa*, для лікування синегнійної інфекції опікових ран без побоювань, що може сформуватись у інфікуючих мікроорганізмів резистентність до офлоксацину.

Основа розроблених мазей сприяє швидкому прониканню офлоксацину в тканини шкіри експериментальних тварин і підтримує в них протягом тривалого часу бактерицидних для основних збудників раневої опікової інфекції концентрацій антибіотика— 35,78 мкг/г.

Негативного впливу на показники імунітету мазі з офлоксацином не виявляють і підвищення показників алергізації у тварин, котрі її отримували, не викликають.

Вплив деяких ПАР на антимікробні властивості і розвиток стійкості до офлоксацину у *P. aeruginosa*

В експериментах *in vitro* збереження бактерицидного ефекту офлоксацину по відношенню до стандартних штамів вищеназаних бактерій спостерігається при додаванні суббактеріостатичних для *P. aeruginosa* концентрацій ПАР. Серед досліджених антисептиків із поверховою активністю розвиток резистентності до офлоксацину найефективніше відвертають ($p < 0,001$) мірамістин й етилендіамінтетраацетат (ЕДТА) і їх одночасна комбінація.

Таким чином, нами запропоновано склади мазей із офлоксацином на гідрофільній основі, котрі мають високі антибактеріальні властивості у відношенні *P. aeruginosa* та супутньої аеробної й факультативно-анаеробної мікрофлори, інфікуючої опікову поверхню, як в експериментах *in vitro* так і в дослідях *in vivo*. Гідрофільна основа мазі підсилює антимікробний ефект офлоксацину, забезпечує виражені протизапаленні і ранозаживляючі властивості препаратів "Офлокаїн" та "Офлотримол".

Нами доведено, що спільне використання офлоксацину і суббактеріостатичних концентрацій одного або декількох іоногенних ПАР підсилює антимікробні властивості антибіотика і попереджує селекцію в популяції стійких до офлоксацину штамів *P. aeruginosa*.

1. Розроблені гідрофільні мазі "Офлотримол" і "Офлокаїн" з антибіотиком офлоксацином є високоефективними препаратами для місцевого лікування інфекцій, викликаних *P. aeruginosa* і супутньою аеробною та факультативно-анаеробною мікрофлорою, у хворих із опіками.

2. *In vitro* офлоксацин володіє вираженими бактерицидними властивостями у відношенні досліджених штамів *P. aeruginosa* (80% чутливих штамів, МПК 50 - 7,75 мкг/мл) і супутньої аеробної та факультативно-анаеробної мікрофлори опікової поверхні.

3. Гідрофільна основа підсилює антибактеріальні властивості офлоксацину *in vitro* і сприяє утворенню в рані бактерицидних концентрацій офлоксацину у відношенні досліджуваних штамів *P. aeruginosa* і супутньої аеробної та факультативно-анаеробної мікрофлори опікової поверхні.

4. Місцеве терапевтичне використання мазей з офлоксацином "Офлокаїн" та "Офлотримол" при лікуванні експериментальної *Pseudomonas*-інфекції опікових ран сприяє елімінації збудника із поверхні опіку при 3-4-х разовому нанесенні та скорочує термін переходу фази запалення у фазу репарації на 5 - 6 діб в порівнянні із відомими препаратами аналогічного призначення.

6. Застосування мазей з офлоксацином *in vitro* не викликає підвищення рівня стійкості стандартного штаму *P. aeruginosa* до офлоксацину.

7. Іоногенні ПАР в суббактеріостатичних концентраціях достовірно ($p < 0,01$) підсилюють антимікробні властивості офлоксацину і перешкоджають підвищенню рівня стійкості *P. aeruginosa* до офлоксацину.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Для підвищення ефективності лікування опікових інфекцій, викликаних *P. aeruginosa*, радимо користуватись мазями "Офлокаїн" та "Офлотримол", які готуються на гідрофільній основі і вміщують антибіотик хінолонового ряду - офлоксацин.

ПЕРЕЛІК РОБІТ, ЯКІ ОПУБЛІКОВАНІ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Обоснование состава и исследование специфического действия мази офлотримол-п для лечения гнойно-некротических процессов// Фармаком. - 1995. - № 3. - С. 3 - 9. (у співавт. із М.О. Ляпуновим, Н.Ф. Масловой, Т.В. Бомко, О.П. Безуглою, Т.І. Таммом, О.О. Лисокобилкою, Ш.Д. Таравнех, О.В. Даценком).

2. Антибактериальная активность офлоксацина в отношении основных возбудителей гнойно-септических хирургических инфекций// Вестник проблем современной медицины. - 1994. - вып. 7. - С. 71 - 74. (у співавт. із А.Я. Циганенком, М.О. Ляпуновим, В.І. Кравцовою).

3. Исследование антимикробной активности офлоксацина в отношении основных возбудителей гнойно-септических хирургических инфекций// Вестник проблем современной медицины. - 1995. - вып. 3. - С. 23 - 29.

4. Сравнительная антибактериальная активность мази с офлоксацином и мази на гидрофильной основе "Левосин" в отношении основных возбудителей гнойно-септических хирургических инфекций// Вестник проблем современной медицины. - 1995. - вып. 12. - С. 108 - 110. (у співавт. із М.О. Ляпуновим, Ш.Д. Таравнех, О.О. Лисокобилкою).

5. Изучение динамики выработки резистентности к офлоксацину у штаммов палочки сине-зеленого гноя //Медицина сегодня и завтра. Сб. науч. раб. молодых ученых и специалистов. Харьков. ХГМУ, 1996. - С. 12.

6. Анализ антибактериальных свойств украинского офлоксацина и мази офлотримол в сравнении с офлоксацином фирм "HOECHST" (Германия) и "SERVO" (Югославия) //Вестник проблем биологии и медицины. - 1996 - вып. 4. - С. 124 - 128. (у співавт. із с М.О. Ляпуновим, А.Я. Циганенком, О.О. Лисокобилкою).

7. Исследование специфического действия мазевых препаратов для лечения раневых инфекций //Вестник проблем биологии и медицины. - 1996. - вып. 5. - С. 123 - 125.

Холбабаева В.О. Експериментальне дослідження мазі з офлоксацином для лікування опіків, інфікованих *P. aeruginosa*. - Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю І4.02.05. - мікробіологія. - Харківський НДІ мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова. Харків, 1997.

Захищається 7 наукових робіт, в яких експериментально обґрунтована доцільність застосування офлоксацину для місцевого лікування опікових ран, інфікованих *P. aeruginosa*, в складі мазей на гідрофільній основі "Офлотримол" і "Офлокаїн" з місцевими анестетиками.

Ключові слова: опіки, *P. aeruginosa*, офлоксацин, мазь.

Kholbabaeva V.A. Экспериментальное исследование мази с офлоксацином для лечения ожогов, инфицированных *P. aeruginosa*. - Рукопись.

Дисертація на соискание научной степени кандидата медицинских наук по специальности І4.02.05. - мікробіологія. - Харьковский НИИ микробиологии и иммунологии им. И.И.Мечникова. Харьков, 1997.

Защищается 7 научных работ, в которых экспериментально обоснована целесообразность применения офлоксацина для местного лечения ожоговых ран, инфицированных *P. aeruginosa*, в составе мазей на гидрофильной основе "Офлокаин" и "Офлотримол" с местными анестетиками.

Ключевые слова: ожоги, *P. aeruginosa*, офлоксацин, мазь.

Kholbabaeva V.A. Experimental research of ointment with ofloxacin for the treatment of burns which has been infected by *P. aeruginosa*. - Manuscript.

Thesis for a candidate's degree by speciality І4.02.05. - microbiology. - Kharkov Research Institute of microbiology and Immunology named after I.I. Mechnikov. - Kharkov, 1997.

The defence covers 7 scientific publications in which experiment had been carried out in necessary conditions of ofloxacin for treatment of place of burns infected by *P. aeruginosa* in the composition of ointment which has been on hydrophilic base with anesthesia on specific place called Oflocain and Oflotrimol.

Key words: burns, *P. aeruginosa*, ofloxacin, ointment.

Ав 39452

АВ 39.452

Підпис. до друку 29.11.1996 р. Формат 60 x 85 1/16. Папір Хероґ.
Ризографія. Ум.-друк. арк. 2,8. Облік.-вид. арк. 2,2. Тираж 120
прим. Зам. №811

ООО ИРФ "Телемак"
Поліграфічний відділ
Україна, 310521, г. Харків-521, Госпром , 5-й під'їзд.