

# Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2005

И. Б. Шилова, Т. А. Гуськова, Н. В. Волчкова

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ СОВРЕМЕННЫХ ПРОТИВОГРИБКОВЫХ СРЕДСТВ

ФГУП ЦХЛС-ВНИХФИ; Москва

В статье описаны материалы и методы исследования сравнительной эффективности противогрибковых препаратов на модели экспериментальной микроспории морских свинок. Проанализированы результаты химиотерапевтической эффективности исследуемых препаратов. Полученные данные позволяют сделать заключение о том, каким препаратам следует отдавать предпочтение при лечении микроспории.

Проблема лечения грибковых поражений кожи и ее дериватов остается актуальной и в настоящее время. Наибольшее распространение среди грибковых поражений кожи имеет микроспория, занимающая второе место после микозов стоп.

Микроспория — высоко контагиозная дерматофития, наиболее часто в 90 % случаев вызываемая зоофильным видом возбудителя *Microsporum canis*. Заболевание характеризуется поражением кожи, волос, изредка — ногтей. Актуальность проблемы зоонозной микроспории вытекает из ее чрезвычайно высокой распространенности и контагиозности, особенно у детей; а также высокой устойчивостью возбудителя к факторам внешней среды [1].

Для местного лечения микроспории и других дерматофитий в настоящее время наибольшее распространение получили следующие препараты: канестен, микозолон, микоспор, мифунгар, низорал, нитрофунгин. Эффективность этих препаратов зависит, главным образом, от локализации грибкового процесса и степени чувствительности возбудителя к лекарственному веществу. Предпочтение использовать то или иное противогрибковое средство нередко продиктовано субъективными причинами, в том числе стоимостью лечения.

В связи с этим представляло интерес провести сравнительное изучение химиотерапевтической эффективности лекарственных препаратов, наиболее часто рекомендуемых для лечения дерматофитий. В качестве модели наибольший интерес представляет экспериментальная микроспория морских свинок. Эта патологическая модель позволяет дать объективную оценку эффективности проводимого лечения. По этиологии и патогенезу экспериментальная микроспория морских свинок близка к таковому заболеванию человека, хотя у животных оно протекает остро с образованием инфильтратов, резкими воспалительными явлениями, обильными экскориациями и заканчивается в течение 35 – 42 дней самоизлечением, в то время как у человека эта инфекция протекает менее остро и более длительно [2, 3].

Тем не менее, на данной экспериментальной модели можно четко проследить состояние кожного покро-

ва и выявить наличие возбудителя в зоне патологического процесса во времени. Сравнительное изучение противогрибковых препаратов в равных условиях эксперимента позволит сделать заключение о том, каким из них следует отдать предпочтение при лечении микроспории кожи.

### Материалы и методы

Исследования проводили на морских свинках-альбиносах, самцах, массой 200 – 300 г. Для заражения использовали штамм *Microsporum canis*, типичный по своим культуральным и биохимическим свойствам. Для заражения брали фрагмент 10 – 12 дневной культуры возбудителя вместе с агаром Сабуро и пораженные им волосы, все растирали в ступке до получения однородной кашицеобразной массы.

У морской свинки на участке спины, лишенном волос, площадью 3 × 4 см<sup>2</sup> кожу скарифицировали острым скальпелем до появления сукровицы. В подготовленный таким образом участок кожи втирали подготовленную смесь для заражения в течение 1 – 2 минут.

Первые клинические признаки заболевания возникали на 5 – 7 день после заражения в виде гиперемии и шелушения кожи, в дальнейшем развивались инфильтраты с экскориациями на поверхности, в которых были заключены обломки пораженных волос. Наличие возбудителя в очагах подтверждалось специфическим свечением в лучах лампы Вуда. Свечение в ультрафиолетовых лучах, пропущенных через фильтр Вуда, характерно только для волос, пораженных грибами рода *Microsporum*. Стекло Вуда состоит из сульфата бария, содержит около 9 % окиси никеля; оно пропускает лучи длиной 365 нм. Для подтверждения проводилось культуральное исследование с последующей микроскопией.

Наблюдение за животными проводили в течение 35 дней с момента заражения. Химиотерапевтическую эффективность препаратов изучали на фоне развившегося инфекционного процесса и оценивали по следующим параметрам:

1) специфическое свечение в лучах лампы Вуда при наличии возбудителя, в баллах, в зависимости от площади поражения и интенсивности свечения;

2) посев и микроскопическое исследование материала (чешуйки, волоски);

3) время восстановления шерстного покрова;

4) местно-раздражающее действие (язвы, струпья, их количество и размеры).

Оценку проводили 1 раз в 7 дней на протяжении всего периода наблюдения. На следующие сутки после последнего применения препарата выявляли наличие возбудителя в очагах по интенсивности и площади свечения, которое оценивали в баллах.

0 баллов — нет свечения;

1 балл — свечение 1 – 25 % площади;

2 балла — свечение 26 – 50 % площади;

3 балла — свечение 51 – 75 % площади;

4 балла — свечение 76 – 100 % площади.

Высчитывали средний индекс поражения (ИП), который представляет собой соотношение степени местного проявления инфекции, площади свечения в баллах к числу животных в группе.

$$\text{ИП} = \frac{\Sigma \text{баллов}}{n};$$

$\Sigma$ баллов — определялась на протяжении всего периода наблюдения — 5 свечений,  $n$  — число животных в группе.

По формуле:

$$\frac{\text{ИП}_k - \text{ИП}_l}{\text{ИП}_k} \cdot 100$$

определяли процент химиотерапевтической эффективности каждого препарата на данной модели.

Микроскопия и посев материала, взятого из мест свечения, производилась на 7 день после заражения и по окончании эксперимента. Материал высевали на агар Сабуро в чашках Петри. Посевы инкубировали при температуре 22 – 30 °С. Рост пушистых, серых с концентрическими кругами колоний *Microsporum canis* отмечался к 6 – 7 дню инкубации в точках внесения материала. При отсутствии роста культуры в точках внесения материала в течение 20 дней результаты посева считали отрицательными. Микроскопия чешуек, взятых из очагов свечения, проводилась после их просветления в 20 % растворе гидроксида калия. Результаты считались положительными, если в исследуемом материале обнаруживались извитые нити мицелия гриба.

Была изучена химиотерапевтическая эффективность следующих лекарственных форм противогрибковых препаратов для наружного применения: клотримазол (крем Канестен 1 %), кетоконазол (крем Низорал 2 %), бифоназол (крем Микоспор 1 %), оксиконазол (крем Мифунгар 1 %), нитрофунгин (раствор 1 %).

Животные были разделены на группы по 6 особей в каждой, включая группу контроля, всего 7 групп. Исследуемые препараты в количестве (~1,5 г препарата на одну аппликацию) наносили на пораженный участок кожи ежедневно (1 раз в сутки) в течение 21 дня.

### Результаты и их обсуждение

В группе контрольных животных на протяжении всего периода наблюдения в очагах поражения отмечалось обильное мелко- и крупнопластинчатое шелушение, изъязвления, покрытые засохшими некротическими массами, а также явления воспаления. Контрольное ярко зеленое свечение по окончании эксперимента оценено на 3,6 балла. После 30 дней наблюдения отмечен рост единичных волосков шерсти. При культуральном исследовании по окончании эксперимента на 6 день экспозиции взятого материала в чашках Петри отмечен рост колоний *Microsporum canis*. При микроскопии светящихся волосков и чешуек обнаружено большое количество мицелиальных нитей гриба.

У животных, которым наносили крем Канестен 1 % (клотримазол) в течение первых 14 дней лечения, наблюдалась гиперемия в очагах поражения и некротические массы. С 15 по 21 дни лечения очаги постепенно очистились, С 23 дня лечения местами началось восстановление шерстного покрова, однако при исследовании в лучах лампы Вуда отмечалось интенсивное свечение отрастающих волосков, которое было оценено в 2,8 балла. При посеве светящихся волосков из очагов, проведенном по окончании наблюдения, отмечался рост колоний гриба. Таким образом, процент химиотерапевтической эффективности лечения данным препаратом в сравнении с контролем составил 22,2.

В группе животных, получавших лечение мазью Микозолон, воспалительные явления (гиперемия, обильное шелушение, некрозы) стихали к 7 дню лечения. Полное очищение от шелушения области инфицирования произошло к 14 дню лечения. С 15-го дня лечения отмечено начало восстановления шерстного покрова. При исследовании в лучах лампы Вуда отмечалось интенсивное зеленое свечение оставшихся и отрастающих волосков. При посеве наблюдался рост

### Химиотерапевтическая эффективность противогрибковых препаратов на модели экспериментальной микроsporии морских свинок

Препарат	% действующего вещества	Индекс поражения (%)	Начало восстановления шерстного покрова, дни	Химиотерапевтическая эффективность (%)	Результаты посева
Крем Канестен (клотримазол)	1	77,8	23	22,2	Положительный
Мазь Микозолон (миконазол + мазипредон)		83,1	15	16,9	Положительный
Крем Микоспор (бифоназол)	1	2,5	25	97,5	Отрицательный
Крем Мифунгар (оксиконазол)	1	34,7	18	65,3	Отрицательный
Крем Низорал (кетоконазол)	2	57,5	15	42,5	Положительный
Раствор Нитрофунгин	1	55,6	25	44,4	Положительный
Контроль		100	30		Положительный

колоний возбудителя. Химиотерапевтическая эффективность данного препарата в сравнении с контролем составила 16,9 %. Раннее восстановление шерстного покрова и быстрое уменьшение признаков воспаления в очагах поражения происходит за счет кортикостероида мази преднона, входящего в состав мази микозолон. Следовательно, назначение микозолон целесообразнее при остром течении инфекционного процесса с целью быстрого купирования воспаления. В дальнейшем входящий в состав мази стероид способствует росту и развитию гриба и препятствует достижению полного излечения.

В группе животных, леченных кремом Микоспор 1 % (бифоназол), отмечалась выраженная гиперемия, некротические массы и обильное шелушение кожи в очагах поражения в течение 14 дней применения препарата. Постепенно к окончанию лечения (21 день) поверхность очагов полностью очистилась, кожа стала гладкой, бледно-розовой окраски, лишенной волос. Начало отрастания шерстного покрова наблюдалось только по окончании применения препарата, на 25 день от начала лечения. При контрольном свечении в лучах лампы Вуда отмечено точечное свечение у 1 из 6 животных группы, которое было оценено в 0,02 балла. Процент химиотерапевтической эффективности в сравнении с контролем наиболее высокий из всех исследуемых препаратов и равен 97,5. Результат посева отрицательный, микроскопическое исследование волосков не обнаружило наличие грибов.

При лечении животных кремом Мифунгар 1 % (оксиконазол) отмечалось обильное мелкопластинчатое шелушение в очагах поражения в течение первых 7 дней применения препарата. К 14 дню лечения поверхность очагов полностью очистилась от чешуек, и с 18-го дня началось восстановление шерстного покрова. При контрольном исследовании в лучах лампы Вуда по окончании эксперимента наблюдалось слабое свечение единичных волосков у 3 из 6 особей группы. Химиотерапевтический эффект данного препарата в сравнении с контролем составил 65,3 %. Результаты посева и микроскопии взятого материала отрицательные.

У животных, леченных кремом Низорал 2 % (кетоназол), в течение первых 14 дней лечения наблюдалось обильное крупно- и мелкопластинчатое шелушение в области поражения. С 15 дня лечения началось очищение кожи в очагах и восстановление шерстного покрова. При контрольном свечении в лучах лампы Вуда отмечалось мелкоочаговое свечение средней интенсивности отрастающей шерсти у всех особей группы. Химиотерапевтический эффект препарата в сравнении с контролем составил 42,5 %. Микроскопическое исследование выявило наличие мицелиальных нитей гриба. При посеве чешуек и волосков шерсти, взятых из светящихся участков, отмечен рост колоний возбудителя.

В группе животных, леченных раствором Нитрофунгина, в течение всего опыта отмечалось наличие в области поражения гиперемии, шелушения и некротических масс. Очищение кожи началось по окончании применения препарата на 25 день лечения, тогда же началось и восстановление шерстного покрова. При контрольном исследовании в лучах лампы Вуда отмечено интенсивное мелкоочаговое свечение в областях поражения. Химиотерапевтический эффект при сравнении с контролем составил 44,4 %. Результаты посева и микроскопии из очагов свечения положительные.

Таким образом, проведенные исследования показали, что все изученные противогрибковые препараты оказывают выраженный терапевтический эффект при местном применении на модели экспериментальной микроспории морских свинок (таблица). Использование их на фоне развившейся грибковой инфекции укорачивало период заболевания.

Однако степень эффективности препаратов была различной. Наибольшей химиотерапевтической эффективностью обладали два препарата: 1 % крем Микоспора (бифоназол) и 1 % крем Мифунгара (оксиконазол). В группах животных, леченных этими препаратами, отмечен высокий процент излеченности грибковой инфекции, при 21 дневном курсе лечения, что было подтверждено различными методами исследования.

В группах животных, леченных кремом Микоспор 1 % (бифоназол), кремом Канестен 1 % (клотримазол) и раствором Нитрофунгин, в областях поражения длительно сохранялись явления воспаления в виде гиперемии и некрозов кожи, что может свидетельствовать о местно-раздражающем действии этих препаратов. У животных этих групп отмечено и более позднее восстановление шерстного покрова, которое наблюдалось только после окончания нанесения препаратов на кожу.

Применение остальных исследуемых противогрибковых препаратов не приводит к санации области поражения за данный период времени, что делает необходимым продолжение лечения после купирования всех видимых проявлений заболевания, до получения отрицательных результатов микроскопического и культурального исследований.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. К. Скрипкин, *Кожные и венерические болезни*, "Медицина", Москва (1980), с. 164.
2. Г. Н. Першин, *Методы экспериментальной химиотерапии*, "Медицина", Москва (1971), с. 538.
3. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Ремедиум, Москва (2000), сс. 293 – 295.

Поступила 09.12.03

## COMPARATIVE EFFICIENCY OF SOME MODERN ANTIMYCOTICS

I. B. Shilova, T. A. Gus'kova, and N. V. Volchkova

Center for Drug Chemistry – All-Russia Research Institute of Pharmaceutical Chemistry, Moscow, Russia

Materials and methods used for comparative evaluation of the efficacy of antimycotics on the experimental model of guinea-pig microsporium are described. The results of the chemotherapy using some drugs are analyzed, and antimycotics ensuring the most effective treatment of microsporium are selected.