

Т. В. Пушкина, Л. Ю. Крылова, С. А. Шарова, Л. А. Чичерина, О. С. Кузина

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ И ТОКСИЧНОСТИ НОВОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ДИОКСИДИНА — МАЗИ “ЛИДОКСИКОЛЬ”

ЦХЛС – ВНИХФИ, Москва, Россия

Изучена антибактериальная активность в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, а также токсичность мази “Лидоксиколь” в сравнении с мазью “Диоксиколь”. Проведенные исследования показали, что новая лекарственная форма диоксида мази “Лидоксиколь” по спектру антимикробного действия, химиотерапевтической эффективности и переносимости идентична мази “Диоксиколь”.

Более 25 лет в клиниках России для лечения различных форм гнойной инфекции применяется препарат “Диоксидин”, который выпускается как в формах для местного применения, так и для введения в полость и внутривенно [1 – 4].

Диоксидин является препаратом с бактерицидным типом действия, в основе которого лежит повреждение биосинтеза ДНК микробной клетки с глубокими нарушениями структуры нуклеоида уже при действии субингибирующих концентраций. Особенностью диоксида как антимикробного агента является отсутствие корреляции эффектов *in vitro* (при определении в аэробных условиях) и в инфицированном организме.

Высокая антибактериальная активность диоксида, широкий спектр действия, включая активность в отношении анаэробных возбудителей, эффективность в клинике при тяжелых формах гнойной инфекции одновременно сочетаются с рядом нежелательных токсикологических характеристик [5].

Исходя из токсикологических свойств, диоксидин противопоказан при индивидуальной непереносимости препарата, недостаточности функции надпочечников, беременности и кормлении грудью. Диоксидин также не разрешен для применения у детей, без четких возрастных ограничений. В настоящее время применение диоксида в педиатрической практике, особенно у недоношенных и новорожденных с целью системного действия, не может быть оправданно, учитывая малую терапевтическую широту, большой риск передозировки и повреждающее действие на надпочечники.

В настоящее время российскими исследователями четко определены показания к назначению диоксида: инфекция, вызванная грамотрицательными бактериями, отсутствие эффекта от предшествующей антибактериальной терапии, профилактика инфекции при протезировании сосудов сердца и аортокоронарном шунтировании в условиях искусственного кровообращения. Препарат используется преимущественно для введения в полость, эндобронхиально или ингаляционно в виде растворов и местно в виде мазевых форм.

Малая терапевтическая широта диоксида диктует строгое соблюдение дозировок, причем не только при применении внутривенно (в/в), но и местно, особенно

при введении в полость, длительном постоянном орошении ран, применении мазей на обширные ожоговые поверхности.

По итогам клинического применения отмечена высокая эффективность мази “Диоксиколь”, содержащей диоксидин в сочетании с тримекаином и метилурацилом. Концентрация диоксида в этой мази снижена до 1 %, что обеспечивает полностью антибактериальный эффект и одновременно, при применении на обширные ожоговые и раневые поверхности, снижает риск нежелательных реакций с возможным всасыванием диоксида [6].

В ЦХЛС — ВНИХФИ разработана новая лекарственная форма диоксида — мазь “Лидоксиколь”, содержащая 1 % диоксида в сочетании с лидокаином и метилурацилом на полиэтиленоксидной основе [7].

Цель настоящего исследования — изучение антибактериальной активности в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, а также изучение токсичности мази “Лидоксиколь” в сравнении с мазью “Диоксиколь”, выпускаемой ОАО “НИЖФАРМ”.

Материалы и методы

В опытах *in vitro* антимикробная активность изучена в отношении тест-штаммов аэробных и анаэробных бактерий и грибов: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Staphylococcus aureus* NCDC 25923, *Staphylococcus aureus* Гупе, *Staphylococcus aureus* Smith, *Staphylococcus aureus* 178, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* NCDC 25922, *Escherichia coli* M-17, *Pseudomonas aeruginosa* NCDC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* 165, *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Proteus vulgaris* NCDC 4636, *C. albicans* 885 – 653, *Bacteroides fragilis* 323, *Bacteroides distasonis* 255/82, *Bacteroides melaninogenicus* 9337, *Bacteroides asaccharolyticus* 1092, *Bacteroides asaccharolyticus* 17, *Fusobacterium nucleatum* 143, *Fusobacterium necroforum* 22, *Peptostreptococcus anaerobius* 891, *Peptococcus asaccharolyticus* 416, *Clostridium perfringens* т. А 88, *Clostridium septicum* 286. Штаммы получены из института стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича.

Определение антибактериального действия в отношении аэробных бактерий проводили методом дву-

кратных серийных разведений в жидкой питательной среде Хоттингера [8, 9]. Активность мазей изучали в концентрациях от 0,5 до 0,007 %. В пробирки с разведениями препаратов вносили инокулят бактерий, приготовленный по стандарту мутности в физиологическом растворе. Микробная нагрузка составляла $1 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Бактерии инкубировали при 37 °С в течение 18 – 24 ч. Активность препаратов учитывали визуально по отсутствию видимого роста, определяя минимальные подавляющие концентрации препаратов (МПК) в %.

Активность препаратов в отношении анаэробных бактерий изучали методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде “Schaedler anaerobe broth” (фирма “Oxoid”), определяя МПК. Микробная нагрузка составляла $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл [10]. Бактерии инкубировали при 35 °С в течение 48 ч. Анаэробные условия создавали, помещая исследуемые объекты в анаэробную станцию (“Jouan”), заполненную газовой смесью CO₂ – 10 %, H₂ – 10 %, N₂ – 80 %. Результаты учитывали через 48 ч инкубирования.

Изучение химиотерапевтической активности в опытах *in vivo* проводили на модели локализованного гнойно-некротического процесса (внутрикожное заражение) [10, 11]. В эксперименте использованы штаммы золотистого стафилококка — *S. aureus* Гуре и *S. aureus* 178 (штамм, устойчивый к метициллину); грамотрицательных бактерий — *Ps. aeruginosa* 165 и *E. coli* 25922, полученные в институте стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им Л. А. Тарасевича.

В экспериментах использовали белых неинбредных мышей обоего пола, массой 15 – 16 г. Для заражения животных использовали суточную культуру возбудителей, выращенную на агаре Хоттингера. Культуру вводили в виде взвеси в изотоническом растворе хлорида натрия, внутрикожно в область брюшка (предва-

рительно выщипав шерсть). Инфицирующая доза (ИД) составляла $1LD_{100}$, что для *Ps. aeruginosa* соответствует $0,5 \cdot 10^7$ КОЕ/мл, для кишечной палочки $(1 - 3) \cdot 10^8$ КОЕ/мл, для стафилококка $8 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Заражающую дозу вводили в объеме 0,05 – 0,1 мл. Через 24 – 48 ч после заражения на месте введения культуры развивался гнойно-некротический процесс. Характер и интенсивность поражений условно обозначали следующим образом:

1. + первая степень поражения — точечные и малые некрозы размером до 2 мм в диаметре и инфильтраты, не сопровождающиеся некротическим процессом;
2. ++ вторая степень поражения — некрозы размером от 3 до 5 мм в диаметре;
3. +++ третья степень поражения — некрозы с диаметром от 6 и более мм;
4. — отсутствие поражений.

В зависимости от величины и интенсивности поражения гнойно-некротические очаги подвергаются обратному развитию через 10 дней после заражения. Суммируя показатели пораженности каждой мыши в течение всего срока наблюдения, выводится средний показатель пораженности на 1 мышью в каждой группе животных. За единицу принимается поражение, обозначенное +. Об эффективности испытуемого препарата судили: 1) по количеству животных, у которых гнойно-некротический процесс не развился; 2) на основании сравнения интенсивности поражений в группах леченных и контрольных животных.

При постановке химиотерапевтического опыта на указанных моделях наблюдение за подопытными животными продолжается до момента полной ликвидации процесса в контрольной группе (в среднем 12 – 15 дней).

Мазь “Лидоксиколь” и “Диоксиколь” наносили мышам ежедневно на пораженные участки в течение 10 дней.

Изучение токсичности мази “Лидоксиколь” в сравнении с мазью “Диоксиколь” проводили в эксперименте на крысах. Мазь крысам наносили в течение 1 месяца

Таблица 1
Антибактериальная активность мази “Лидоксиколь” в сравнении с мазью “Диоксиколь” *in vitro* в отношении аэробных бактерий

Штамм микроорганизмов	МПК, %	
	Лидоксиколь	Диоксиколь
<i>S. aureus</i> ATCC 6533-P	0,12	0,12
<i>S. aureus</i> NCDC 25923	0,12	0,12
<i>S. aureus</i> 178	0,25	0,25
<i>S. aureus</i> Гуре	0,12	0,12
<i>S. aureus</i> Smith	0,12	0,12
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0,06	0,06
<i>E. coli</i> NCDC 25922	0,03	0,03
<i>E. coli</i> M-17	0,015	0,015
<i>P. vulgaris</i> ATCC 6896	0,06	0,06
<i>P. vulgaris</i> NCDC 4636	0,12	0,12
<i>P. aeruginosa</i> NCDC 27853	0,12	0,12
<i>P. aeruginosa</i> 165	0,06	0,06
<i>C. albicans</i> 885 – 653	0,5	0,5

Таблица 2
Антибактериальная активность мази “Лидоксиколь” в сравнении с мазью “Диоксиколь” *in vitro* в отношении анаэробных бактерий

Штамм микроорганизмов	МПК, %	
	Лидоксиколь	Диоксиколь
<i>B. fragilis</i> 323	0,015	0,015
<i>B. melaninogenicus</i> 9337	0,03	0,03
<i>B. distasonis</i> 255/82	0,03	0,03
<i>B. asaccharolyticus</i> 1092	0,03	0,03
<i>B. asaccharolyticus</i> 17	0,03	0,03
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> 891	0,06	0,06
<i>Peptococcus asaccharolyticus</i> 416	0,06	0,06
<i>F. nucleatum</i> 143	0,06	0,06
<i>F. necroforum</i> 22	0,06	0,06
<i>Cl. perfringens</i> т.А 88	0,12	0,12
<i>Cl. septicum</i> 286	0,06	0,06

ца на эпилированный скарифицированный участок кожи на спине в дозе 4,0 г/кг. Указанная доза превышает рекомендуемую терапевтическую суточную дозу человека примерно в 18 раз. По окончании эксперимента проведены гематологические, биохимические и патоморфологические исследования.

Результаты и их обсуждение

В результате опытов *in vitro* установлено, что мазь “Лидоксиколь”, так же как и “Диоксиколь”, проявляет активность в отношении аэробных бактерий. Наибольшую активность проявляют обе мази в отношении грамотрицательных бактерий: 2 штаммов кишечной палочки *E.coli* 25922 и М-17 (МПК составляет соответственно 0,015 и 0,03 %) (табл. 1). Штаммы синегнойной палочки *P. aeruginosa* NCDC 27853 и *P. aeruginosa* 165 более устойчивы (МПК колеблется от 0,06 до 0,12 %). Активность обеих мазей в отношении 2 штаммов *P. vulgaris* составила от 0,06 до 0,12 % и в отношении *B. subtilis* — 0,06 %. Установлена активность мазей в отношении грамположительных бактерий — 5 штаммов золотистого стафилококка, в том числе: *S. aureus* ATCC 6533-Р, *S. aureus* NCDC 25923, *S. aureus* Гуре и *S. aureus* Smith в концентрации 0,12 %, а также полирезистентного штамма *S. aureus* 178 в концентрации 0,25 %. Наименьшую активность проявили обе мази в отношении *C. albicans* — МПК составила 0,5 %.

В табл. 2 представлены результаты изучения мазей “Лидоксиколь” и “Диоксиколь” на антибактериальную активность в отношении облигатных анаэробных бактерий.

Как видно из табл. 2, мази “Лидоксиколь” и “Диоксиколь” проявляют высокую активность в отношении широкого спектра облигатных анаэробов — спорообразующих и не образующих споры (неклостридиальных). Наибольшую активность показали мази в отношении бактериоидов: МПК в отношении *B. fragilis*, *B. melaninogenicus*, *B. distasonis* и 2 штаммов *B. asaccharolyticus* колебалась от 0,015 до 0,03 %. Активность в отношении 2 штаммов мази лидоксиколь и диоксиколь подавляли рост неклостридиальных анаэробных бактерий *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptococcus asaccharolyticus* и 2 штаммов *Fusobacterium* в концентрации 0,06 %. Активность мазей в отношении 3 штам-

мов клостридий составила: *Cl. septicum* — 0,06 %, *Cl. perfringens* — 0,12 %.

В опытах *in vivo* на моделях локализованного гнойно-некротического процесса белых мышей, вызванного внутрикожным введением стафилококка (*S. aureus* 178, *S. aureus* Гуре) и грамотрицательными бактериями (*E. coli*, *P. aeruginosa*) на фоне тяжелого гнойно-некротического процесса проводили сравнительное изучение химиотерапевтической эффективности мази “Лидоксиколь” и мази “Диоксиколь”. Лечение начинали на 3-й день после заражения и проводили ежедневно в течение 10 дней. В табл. 3 представлены результаты экспериментального изучения *in vivo*.

При заражении животных *S. aureus* Гуре процесс развивается быстро, через 48 ч максимальная величина поражений третьей степени доходит до 1 см в диаметре. Как показано в табл. 3, обе мази обладают выраженным лечебным эффектом. При тяжело протекающем гнойно-некротическом процессе (индекс поражения в контроле — 26,1) эффективность мази “Лидоксиколь” составила 53 % и мази “Диоксиколь” — 48 %.

При заражении животных *S. aureus* 178 (полирезистентный штамм, устойчивый к метициллину) эффективность мази “Лидоксиколь” увеличивается до 57 % и мази “Диоксиколь” — 58 %. Высокая активность мазей в отношении устойчивого штамма золотистого стафилококка дает основание рекомендовать эти препараты при устойчивости или непереносимости к антибиотикам.

Обе мази проявляют выраженный химиотерапевтический эффект при гнойных процессах, вызванных синегнойной и кишечной палочками. Коэффициент терапевтической эффективности составляет 49 – 52 % при гнойном процессе, вызванном кишечной палочкой, и 51 – 53 % при синегнойной инфекции.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что мази “Лидоксиколь” и “Диоксиколь” характеризуются широким антибактериальным спектром в отношении грамположительных и грамотрицательных аэро- и анаэробных бактерий с преимущественной наиболее высокой активностью в отношении облигатных анаэробов (спорообразующих и не образующих споры). Мазь “Лидоксиколь” по спектру антибактериального действия идентична мази “Диоксиколь”.

Таблица 3

Химиотерапевтическая активность мазей “Лидоксиколь” и “Диоксиколь” на модели гнойно-некротического процесса у мышей, вызванного различными возбудителями

Возбудители гнойно-некротического процесса	Лидоксиколь		Диоксиколь		Контроль	
	Индекс поражения, балл	ТЭ, %	Индекс поражения, балл	ТЭ, %	Индекс поражения, балл	ТЭ, %
<i>S. aureus</i> Гуре	12,4	53	13,6	48	26,1	—
<i>S. aureus</i> 178	105	57	9,9	58	22,3	—
<i>E. coli</i>	11,6	52	12,1	49	23,8	—
<i>P. aeruginosa</i>	11,8	53	12,3	51	25,2	—

Сравнительное изучение химиотерапевтической активности мазей “Лидоксиколь” и “Диоксиколь” показало, что обе лекарственные формы оказывают выраженный лечебный эффект на моделях гнойно-некротического процесса, вызванного различными возбудителями, и коэффициент терапевтической эффективности (ТЭ) достигает 48–53%. Активность той и другой мази достигала 57–58% на модели гнойно-некротического процесса, вызванного золотистым стафилококком штамма 178, устойчивого к метициллину.

Изучение общетоксических свойств мази “Лидоксиколь” в сравнении с мазью “Диоксиколь” показало, что аппликации обоих препаратов в течение 1 мес в дозе 4,0 г/кг не вызывают гибели животных и не влияют на их общее состояние и поведение. В проведенных по окончании эксперимента клинических исследованиях было установлено, что состояние гомеостаза подопытных животных не претерпевало заметных изменений по сравнению с контролем: гематологические и биохимические показатели крови находились в пределах физиологической нормы. Патоморфологическое исследование не выявило следов повреждающего воздействия препаратов на структуру внутренних органов. При визуальном обследовании кожи подопытных животных также не обнаружено каких-либо изменений (покраснения, шелушения, нарушения эластичности), свидетельствующих о наличии местно-раздражающего действия препаратов. У контрольных и подопытных крыс в месте воздействия на коже обнаружены лишь следы скарификации.

Результаты гистологического исследования кожи крыс также свидетельствуют об отсутствии местно-раздражающего действия у сравниваемых препаратов: воспалительных инфильтратов в дерме и измене-

ний в эпидермисе не выявлено. Препараты не вызывают изменений в соотношении толщины слоев и сдвигов в интенсивности пролиферативно-десквамативных процессов в эпидермисе. Поверхностный слой эпидермиса с признаками структурно-функциональной активности пронизан выводными протоками желез и волосками шерстного покрова. В волокнистой дерме расположены волосяные фолликулы и поврежденные потовые и сальные железы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. Н. Падейская, *Антибактериальные препараты*, Т. 1, Медицина, Москва (1984), сс. 6–23.
2. Е. Н. Падейская, *Новые лекарственные препараты. Экспресс-информация*, № 7, 1–18 (1989).
3. Е. Н. Падейская, *Дисс. д-ра мед. наук*, Москва (1983).
4. Е. Н. Падейская, *Инфекции и антимикроб. тер.*, 3(5), 150–155 (2001).
5. Т. А. Гуськова, Л. А. Чичерина, Л. К. Романова, *Антибактериальные препараты*, Т. 1, Медицина, Москва (1984), сс. 51–54.
6. В. П. Яковлев, Л. А. Блатун, Ф. Ф. Звягин, *Тез. докл. междунар. конф. по ранам и раневой инфекции*, Москва (1998), сс. 193–195.
7. Р. Г. Глушков, Н. В. Сазонов, Л. Б. Алтухова и др., *Комбинированное противомикробное средство для лечения гнойных ран*, Патент РФ RU 2283088C2 от 10.09.2006, *Бюл. изобрет.*, 325 (2006).
8. Г. Н. Першин, *Методы экспериментальной химиотерапии*, Медицина, Москва (1971), сс. 100–103.
9. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Медицина, Москва (2005), сс. 515–531.
10. Л. Г. Мясникова, *Антибиотики*, № 3, 230–235 (1987).
11. Г. Н. Першин, *Методы экспериментальной химиотерапии*, Медицина, Москва (1971), сс. 111–115.

Поступила 04.06.07

EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE CHEMOTHERAPEUTIC EFFICACY AND TOXICITY OF THE NEW MEDICINAL FORM OF DIOXIDINE: LIDOXICOL OINTMENT

T. V. Pushkina, L. Yu. Krylova, S. A. Sharova, L. A. Chicherina, and O. S. Kuzina

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

The antibacterial activity *in vitro* and *in vivo* and the toxicity of Lidoxycol ointment, which is a new medicinal form of dioxidine, have been studied in comparison to the properties of Dioxycol ointment. The results showed that Lidoxycol is identical to Dioxycol with respect to the spectrum of antimicrobial action, chemotherapeutic efficiency, and tolerance.