

(19) **KG** (11) **1029** (13) **C1** (46) **30.03.2008**ГОСУДАРСТВЕННАЯ ПАТЕНТНАЯ СЛУЖБА  
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ(51) *A61K 31/00* (2006.01)**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ****к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя (владельца)**

(21) 20040116.1

(22) 02.12.2004

(46) 30.03.2008, Бюл. №3

(76) Мырзалиев Б.Б., Алишеров А.Ш. (KG)

(56) Заявка RU №94038300, кл. A61K 31/00, 1996

**(54) Средство для подавления мультирезистентных штаммов туберкулеза**

(57) Изобретение относится к области медицины и может применяться для лечения больных туберкулезом, у которых заболевание было вызвано мультирезистентными штаммами микобактерий туберкулеза. Задачей изобретения является увеличение возможностей использования бактерицидной жидкости, полученной на основе рыбьего жира. Поставленная задача решается тем, что эктерицид применяют в качестве бактерицидного препарата в отношении мультирезистентных штаммов микобактерий туберкулеза. 2 табл., 1 ил.

Изобретение относится к области медицины и может применяться для лечения больных туберкулезом, у которых заболевание было вызвано мультирезистентными штаммами микобактерий туберкулеза.

Литературные данные свидетельствуют, что, несмотря на наличие большого количества препаратов с противомикробным действием, здравоохранение все время испытывает недостаток активных антимикробных средств применяемых для лечения лекарственноустойчивых форм заболеваний, в особенности туберкулеза, а также для местного лечения послеоперационных гнойных ран, свищей, пролежней, термических поражений и трофических язв, представляющих одну из сложных проблем современной медицины.

Медицине хорошо известен рыбий жир *Oleum jecoris* – витаминный препарат- жидкое, прозрачное, жирное масло, получаемое из свежей печени тресковых рыб. В виде следов в рыбьем жире определяются йод, бром, железо, кальций, органические соединения фосфора, серы и некоторые другие вещества. Тресковый рыбий жир применяется как общеукрепляющее средство.

В 1947 г. Горгиев Т.Б. из рыбьего жира получил антисептик – бактерицидную жидкость – «Эктерицид» (Горгиев Т.Б. – К вопросу о выделении бактерицидных факторов рыбьего жира. В кн.: Труды Дагестанск. мед. ин-та, 3, 1947).

Этот препарат является продуктом окисления рыбьего жира под влиянием физических факторов. Бактерицидная жидкость обладает выраженной антибактериальной активностью в отношении пиогенной микрофлоры, малотоксична, не вызывает раздражения при местном применении. Препарат характеризуется высокой бактерицидной активностью в отношении большинства патогенных микроорганизмов, в том числе и в отношении возбудителя туберкулеза – палочки Коха. Препарат имеет бактерицидный и бактериостатический эффект и оказывает иммуностимулирующее и местное противовоспалительное действие, ускоряя процессы клеточной регенерации,

(19) **KG** (11) **1029** (13) **C1** (46) **30.03.2008**

стимулируя клеточные и гуморальные факторы защиты. Препарат также ускоряет эпителизацию, препятствует образованию грубых келлоидных послеожоговых и послеоперационных рубцов.

В исследованиях *in vitro* установлен механизм бактерицидного действия эктерицида на микобактерии (Дикий И.А., Черкасс Г.П., Дикая Е.М. Механизм действия эктерицида на микобактерии туберкулеза // Проб. Туберкулеза. – Москва, 1984. – №3, С. 60-63). Проведенные авторами специальные исследования показали, что бактерицидная жидкость оказывает на микобактерии туберкулеза преимущественно ингибирующее действие.

Известна заявка RU №94038300, кл. А61К 31/00, 1996, суть которой заключается в том, что рыбий жир трехиглой корюшки применяется в качестве противотуберкулезного средства.

Недостаток изобретения в том, что сам по себе рыбий жир оказывает слабое бактерицидное и бактериостатическое действие и поэтому препарат мало эффективен и он не действует на лекарственно устойчивые штаммы туберкулеза.

Известно, что бактерицидная жидкость эктерицид подавляет культуры штаммов туберкулеза человеческого типа ( $H_{37}rv$ ), бычьего типа (Равинел), несмотря на многочисленные исследования препарата, свидетельствующие о его активности по отношению к некоторым лекарственно устойчивым штаммам туберкулеза, до сих пор официально препарат рекомендован только для лечения нагноившихся послеоперационных и травматических ран, фурункулов, ожогов, свищевых форм остеомиелита, т.к. обладает антибактериальной активностью.

Задачей изобретения является увеличение возможностей использования бактерицидной жидкости, полученной на основе рыбьего жира.

Поставленная задача решается тем, что эктерицид применяют в качестве бактерицидного препарата в отношении мультирезистентных штаммов микобактерий туберкулеза.

Основным методом определения активности препарата является метод диффузии: В чашки Петри диаметром 9-10 см с ровным гладким дном, установленные на горизонтальный столик, выверенный по уровню, наливают 20 мл 2% агара. После того как агар в чашке застыл, наливают второй слой питательного агара по 5 мл с тест-микроорганизмом, который добавляли к расплавленному и охлажденному до 55°C агару. После затвердения второго слоя на поверхности агара, специальной острой трубкой диаметром 10 мм, присоединенной к вакууму в агаре вырезают 6 лунок, в которые закапывают раствор бактерицидной жидкости в определенных разведениях и стандартный раствор антибиотика с уже известной концентрацией (контроль). Чашки выдерживают 18-24 часа при температуре 37°C. После чего измеряют диаметр зон отсутствия роста тест – микроба. Активность испытуемого препарата рассчитывают в сопоставлении с данными измерения зоны задержки роста, стандартного раствора известной концентрации.

Испытания антибиотической активности основаны на прямом воздействии изучаемого вещества на живую бактериальную клетку в питательной среде.

Для установления антибиотической активности применяют количественный метод серийных разведений, при котором используют тест-микроорганизм определенной концентрации, строго определенного возраста, выросший на среде определенного состава.

Для определения концентрации антибактериального препарата в используемом растворе готовят стандартные растворы препарата, содержащие разные дозы. Различные разведения исследуемого раствора добавляют к питательной среде с тест микробом.

Объект исследования: Используются опытные серии эктерицида разных сроков созревания.

- Эктерицид трехдневный, свежий.
- Эктерицид пятидневный, свежий.
- Эктерицид семидневный, свежий.
- Эктерицид семидневный, хранившийся 12 мес. при +4°C.
- Эктерицид изготовленный по Горгиеву – контроль.

Для приготовления эктерицида используется очищенный медицинский рыбий жир из печени тресковых рыб, предназначенный для внутреннего применения, произведенный фармацевтическими компаниями г. С-Петербурга и г. Харькова. В 1 г препарата содержится от 350 МЕ витамина А и от 50 МЕ витамина Д.

С целью определения бактерицидного действия, минимальной бактерицидной концентрации, и сравнения свойств полученного семидневого эктерицида с контролем нами было изучено 50 штаммов микобактерий туберкулеза, выделенных от больных легочным туберкулезом, из них 38 полирезистентных (29 HRES и 9 HRS), штаммы, устойчивые к изониазиду, этамбутолу и стрептомицину (HES – 1), штаммы, устойчивые к изониазиду и стрептомицину (HS – 2), моноре-

зистентные штаммы, устойчивые к стрептомицину (S – 3). В качестве контроля взяты: лекарственно чувствительные штаммы (№-5) и (H<sub>37</sub>-1).

Из 50 всех изученных лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий 31 выделены у больных хроническими формами легочного туберкулеза и 14 – у впервые выявленных больных туберкулезом легких.

Перед испытанием из отобранных образцов путем пересева их получали культуры одного срока выращивания (14-21 день). Приготовленную по стандарту мутности взвесь микобактерий (500.000 тыс. микробных тел/мл), гомогенизированную на аппарате Vortex, в дозе 0.1 мл. (0.1мг) вносили в 1 мл испытуемого эктерицида и в 1 мл. физиологического раствора (контроль). Через 48 часов экспозиции в термостате при 37°C производили высев 0.1 мл смеси каждой культуры туберкулезных микобактерий с испытуемыми препаратами и физиологическим раствором на среду Левенштейна-Йенсена. Результаты учитывали через 38-56 дней после посева.

Результаты изучения антимикробного действия бактерицидной жидкости на лекарственно устойчивые штаммы микобактерий туберкулеза приведены в таблице 1, где Н – иониазид, К – рифампицин, Е – этамбутол, S – стрептомицин.

Во всех пробирках, в которых были сделаны посевы испытанных лекарственно-устойчивых штаммов МБТ, которые находились в непосредственном контакте с исследуемым и контрольным эктерицидом, рост культур полностью отсутствовал. Бактериологическая эффективность исследуемого и контрольного эктерицида составила 100%. При проверке результатов взвеси испытанных штаммов микобактерий, находящихся в физиологическом растворе, на поверхности питательной среды во всех случаях получен сплошной рост микобактерий туберкулеза, свидетельствующий о жизнеспособности и биологической активности испытанных культур.

Бактерицидную активность оценивали по определению минимальной бактерицидной концентрации (МБК) методом серийных разведений. Для проведения исследований потребовалось четыре группы препаратов: свежий семидневный эктерицид, семидневный эктерицид хранившийся 1 год, и в качестве контроля бактерицидной активности исследуемых препаратов эктерицид изготовленный по методу Горгиева свежий и хранившийся 1 год. В каждой группе для детекции активности МБТ присутствовал контроль – физиологический раствор.

В экспериментах по определению активности и минимальной бактерицидной концентрации свежего и хранившегося семидневого эктерицида, использовались уже изученные в предыдущих опытах 50 штаммов МБТ (38 мультирезистентных). Исследуемые культуры микобактерий были взяты в дозах 0.1 и 0.01 мл. Приготовленную по стандарту мутности (500.000 тыс. микр. тел/мл) взвесь микобактерий, гомогенизированную на аппарате Vortex, в дозах 0.1мл. и 0.01мл. вносили в каждую из четырех рядов по 10 пробирок. В 10 пробирках методом серийных разведений готовились необходимые концентрации исследуемых эктерицидов. Так в первой пробирке находилось 4 мл. цельного исследуемого препарата, в остальных девяти пробирках по 2 мл. физиологического раствора. Для получения двукратного разведения исследуемой жидкости в каждой последующей пробирке, из первой пробирки забирали 2 мл. исследуемой жидкости и помещали в следующую, которую тщательно перемешивали и забирали из нее 2 мл. в следующую, и так до последней пробирки, которая оставалась не разведенной, из предпоследней пробирки 2 мл сливали. Таким образом, получен ряд из 10 пробирок, в первой из которых находился цельный исследуемый продукт, во второй исследуемый продукт разведенный в 2 раза, и в каждой последующей разведение возрастало в 2 раза, а в последней находился чистый физиологический раствор в качестве контроля активности МБТ.

Схема разведения эктерицида и методика постановки опыта представлены на рис. 1.

1) Три ряда препаратов:

Бактерицидная жидкость свежая.

Бактерицидная жидкость хранившаяся 1 год.

Бактерицидная жидкость по Горгиеву.

2) В каждую пробирку разлиты взвеси микробов по 0.1 мл. (приготовленную по стандарту мутности 500 тыс. микробных тел/мл).

3) Помещены в термостат на 48 часов

4) Высеяны на чашки по 0.1 мл.

5) Результаты на 38-56 сут после посева.

Для дозы 0.01 мл были проведены идентичные исследования. Результаты проведенных исследований отображены в таблицах 2 и 3.

Бактерицидная активность и минимальная бактерицидная концентрация свежего и хранившегося семидневного Эктерицида показана в таблице 2.

Исследуемые культуры микобактерий были взяты в дозах 0.1 мл., приготовленные по стандарту мутности соответствующие (500.000 тыс. микробных тел/мл).

По результатам проведенных исследований видно, что бактерицидная активность свежего и хранившегося семидневного эктерицида идентична.

Минимальная бактерицидная концентрация как свежего, так и хранившегося 1 год семидневного эктерицида была соответственно одинаковой. Единичные колонии в обеих группах стали появляться в разведениях 1:32 и далее с ростом разведения количество выросших колоний соответственно увеличивалось. Сплошной рост в пробирках с контролем (физиологический раствор) – свидетельствует о жизнеспособности и биологической активности исследуемых культур.

Соответствие результатов свежего семидневного и свежего изготовленного по Горгиеву эктерицида, а также хранившегося семидневного и хранившегося изготовленного по Горгиеву эктерицида, в обеих исследуемых группах, свидетельствует о высокой степени соответствия семидневного эктерицида, эктерициду изготовленному по методу Горгиева.

Анализ проведенных исследований подтверждает вышеприведенные результаты, с той лишь разницей, что минимальная бактерицидная концентрация проявляется в разведении 1:64, вследствие того, что во втором случае исследуются культуры микобактерий в дозе 0.01 мл.

Полученные результаты свидетельствуют о выраженном действии на чувствительные к антибактериальным препаратам и на мультирезистентные штаммы микобактерий туберкулеза свежего эктерицида, а также хранившегося спустя 1 год после изготовления.

Таким образом, в прямых опытах *in vitro* установлено бактерицидное действие и минимальная бактерицидная концентрация, полученного по методу Горгиева и по усовершенствованной методике получения эктерицида, на мультирезистентные штаммы микобактерий туберкулеза. Полученные результаты могут быть внедрены после окончания научных исследований при организации производственного выпуска эктерицида и получения на это разрешения Фармкомитета КР.

На основе эктерицида возможно изготовление различных лекарственных форм для наружного и внутреннего применения.

Таблица 1

Данные антимикробного действия бактерицидной жидкости  
на мультирезистентные штаммы бактерий туберкулеза

№	Кол-во штаммов	Резистентность к противотуберкулезным препаратам	Интенсивность роста		
			Эктерицид контроль	Семидневный Эктерицид	Физиологический раствор
1	1	H <sub>37</sub>	0	0	сплошной
2	5	чувствительный	0	0	сплошной
3	3	S	0	0	сплошной
4	2	HS	0	0	сплошной
5	1	HES	0	0	сплошной
6	9	HRS	0	0	сплошной
7	29	HRES	0	0	сплошной

Таблица 2

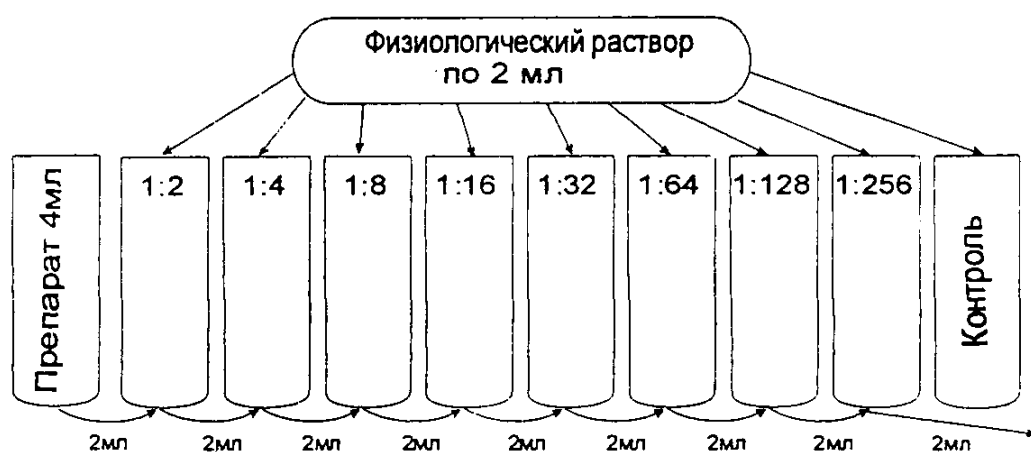
Бактерицидная активность и минимальная бактерицидная

концентрация свежего и хранившегося семидневного Эктерицида

Исследуемые препараты	Цель-ный	Разведение								Физиологический раствор (контроль)
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	
Эктерицид семидневный свежий	0	0	0	0	0	Единичные колонии	Группы колонии	Скопления колонии	Много	Сплошь
Эктерицид семидневный хранившийся 1 год	0	0	0	0	0	-П-	-П-	-П-	Много	Сплошь
Эктерицид по Горгиеву свежий	0	0	0	0	0	-П-	-П-	-П-	Много	Сплошь
Эктерицид по Горгиеву хранившийся 1 год	0	0	0	0	0	-П-	-П-	-П-	Много	Сплошь

### Формула изобретения

Применение эктерицида в качестве бактерицидного препарата в отношении мультирезистентных штаммов микобактерий туберкулеза.



Фиг. 1

Составитель описания  
Ответственный за выпуск

Усубакунова З.К.  
Чекиров А.Ч.