

Міністерство охорони здоров'я України
Національний фармацевтичний університет

ДОРОШЕНКО АННА ІГОРІВНА

УДК 615.015:546.57:541.182.024:612.08

**СОРБЦІЙНА ТА ПРОТИМІКРОБНА ЕФЕКТИВНІСТЬ КОМПОЗИТУ
НАНОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМУ
З ПОЛІГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНІДИНУ ГІДРОХЛОРИДОМ**

14.03.05 – фармакологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

Харків – 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі фармакології

Національного медичного університету імені О. О. Богомольця МОЗ України,
м. Київ.

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор
ЗАЙЧЕНКО Ганна Володимирівна,
Національний медичний університет
імені О. О. Богомольця МОЗ України (м. Київ),
завідувач кафедри фармакології

Офіційні опоненти: доктор фармацевтичних наук, професор
ЦУБАНОВА Наталя Анатоліївна,
Національний фармацевтичний університет (м. Харків),
професор кафедри клінічної фармакології ІПКСФ НФаУ

доктор медичних наук, професор
ВОЛОЩУК Наталія Іванівна,
Вінницький національний медичний університет
імені М. І. Пирогова (м. Вінниця),
завідувач кафедри фармакології

Захист відбудеться «___» _____ 2021 р. о ___ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.03 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4).

Автореферат розісланий «___» _____ 2021 р.

Учений секретар спеціалізованої
вченої ради д. фарм. н.,
професор

К. Г. Щокіна

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Проблема лікування ран, у тому числі гнійних, залишається одним із пріоритетних завдань сучасної практичної медицини, зокрема в хірургії (Мохова О. С., 2013).

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, у світі щорічно реєструється 11 млн випадків опіків, з яких 180 тисяч закінчуються летально (ВНО, 2019). Приблизно 90 % усіх опіків трапляються у країнах із низьким та середнім рівнем доходу (Marc G. Jeschke et al., 2020). Одразу після термічної травми опікова поверхня є стерильною, проте з часом її колонізують мікроорганізми (Souto E. B., 2020). Інфекційні ускладнення складають приблизно 76,3 % у структурі летальності постраждалих із опіковою травмою (Нагайчук В. І. та ін., 2014, Gel'fand B. R. et al., 2015).

Для лікування поверхневих опіків в основному використовуються місцеві протимікробні засоби, що сповільнюють септичні процеси (Marc G. Jeschke et al., 2020), сорбенти для видалення з поверхні опіку мікроорганізмів, токсинів та продуктів розпаду тканин. Проте, незважаючи на значний асортимент антимікробних засобів, постійно зростає кількість антибіотикорезистентних мікроорганізмів (ВНО, 2019). У глобальних масштабах захворювання, викликані стійкими до антибіотиків мікроорганізмами, уже зараз призводять, як мінімум, до 700 тис випадків смерті на рік. У разі бездіяльності цей показник до 2050 р. може зрости до 10 млн випадків смерті у світі (IACG United, 2019).

Вищезазначене стало підставою для вивчення ефективності та безпечності нової комбінації нанодисперсного кремнезему та полігексаметиленгуанідину гідрохлориду (НДК+ПГМГ-ГХ) як потенційного лікарського засобу для лікування термічних та інфікованих ран.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами

Робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт кафедри фармакології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця МОЗ України в рамках теми «Експериментальні дослідження нанодисперсного кремнезему з гуанідином» (№ державної реєстрації 0115U004157), строки виконання: 01.01.2015 – 31.12.2018). Дисертант є співвиконавцем зазначеної теми.

Мета і завдання дослідження. *Мета роботи* – дослідження сорбційних та протимікробних властивостей композиту нанодисперсного кремнезему і полігексаметиленгуанідину гідрохлориду та обґрунтування доцільності його використання для лікування термічних та інфікованих ушкоджень шкіри.

Досягнення цієї мети базувалося на вирішенні таких завдань:

1. Визначити параметри гострої токсичності композиту НДК+ПГМГ-ГХ за умов внутрішньошлункового та наскірного нанесення.
2. Дослідити сорбційні властивості композиту НДК+ПГМГ-ГХ *in vitro*.
3. Вивчити протимікробну активність композиту НДК+ПГМГ-ГХ *in vitro*.
4. Встановити вплив композиту НДК+ПГМГ-ГХ на процес формування біоплівки та на здатність до руйнування сформованої біоплівки.

5. Оцінити ефективність композиту НДК+ПГМГ-ГХ на моделі термічної рани шкіри в досліджах *in vivo*.

6. Встановити ефективність композиту НДК+ПГМГ-ГХ на моделі інфікованої рани шкіри в досліджах *in vivo*.

7. Дослідити морфологічні прояви загоєння термічних та інфікованих ушкоджень шкіри при застосування композиту НДК+ПГМГ-ГХ.

Об'єкт дослідження – фармакологічна корекція термічних та інфікованих ушкоджень шкіри.

Предмет дослідження – фармакологічні властивості композиту НДК+ПГМГ-ГХ в умовах експериментального термічного та інфікованого ушкодження шкіри.

Методи дослідження. Використовувалися токсикологічні (вивчення гострої токсичності за умов внутрішньошлункового введення та нашкірного нанесення), фармакологічні (моделювання термічного опіку II ступеня, гнійного абсцесу, викликаного *Pseudomonas aeruginosa*); мікробіологічні (визначення МІК та МБК, впливу на біоплівки, впливу на рухову активність *P. aeruginosa*, впливу на гідрофобність поверхні бактеріальних клітин та їх адгезивну активність), гематологічні (визначення вмісту лімфоцитів, моноцитів, базофілів), біохімічні (визначення вмісту інтерлейкіну 1β (IL- 1β), фактора некрозу пухлин α (TNF- α), інтерлейкіну 10 (IL-10), загальних метаболітів оксиду азоту, нітрит-аніонів, нітратів у шкірі та крові, активності супероксиддисмутази (СОД), каталази (Кат), активних продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП), дієнових кон'югатів (ДК) у шкірі, фізико-хімічні (визначення сорбційних властивостей), морфологічні (дослідження мікроскопічної структури шкіри), планіметричні (визначення зміни площі термічного опіку), статистичні методи дослідження.

Наукова новизна одержаних результатів. Оригінальна комбінація фармакологічно активних речовин, що мають протимікробну та сорбційну дію у формі суспензії, створена вперше і призначена для лікування термічних та інфікованих уражень шкіри при нашкірному нанесенні. Фармакологічну дію забезпечують такі відомі субстанції, як нанодисперсний кремнезем (НДК) та полігексаметиленгуанідину гідрохлорид (ПГМГ-ГХ). Ці субстанції були використані для розробки нового композиту, який отримав умовну назву НДК+ПГМГ-ГХ (НДК – 50 мг/мл, ПГМГ-ГХ – 10 мг/мл).

Вперше доведено, що за токсичністю композит НДК+ПГМГ-ГХ у дозі 2000 мг/кг (400 мг/кг у перерахунку на ПГМГ-ГХ) належить до VI класу токсичності «відносно нешкідливі речовини» при нашкірному нанесенні та IV класу токсичності «малотоксичні речовини» – при внутрішньошлунковому введенні.

Встановлено, що композит НДК+ПГМГ-ГХ виявляє виражену сорбційну активність щодо низько- і середньомолекулярних сполук. Помірна активність спостерігалася відносно високомолекулярних сполук, яка збільшувалася зі зниженням рН майже вдвічі – з $26,2 \pm 1,29$ до $50,2 \pm 2,5$ мг/г.

Проведені дослідження дозволили встановити, що композит виявляє протизапальну та ранозагоювальну активність. Вказані властивості підтверджені позитивним впливом на швидкість і терміни загоєння термічного опіку (на 28 добу спостереження площа рани скорочувалася на 99,5 %), нормалізації цитокінового

профілю та показників стану окисно-антиоксидантної системи: рівень про- та протизапальних цитокінів у вогнищі ураження нормалізувався на 28 добу спостереження, рівень ТБК-АП – на 21 добу, а ДК – на 28 добу спостереження, активність ферментів СОД і Кат відновлювалася на 7 і 21 добу відповідно.

Поглиблені існуючі дані про терапевтичні властивості композиту НДК+ПГМГ-ГХ, зокрема ефективність при лікуванні гнійного абсцесу, викликаного *P. aeruginosa*, що підтверджувалася відсутністю генералізованої інфекції (з проб крові тварин, які отримували лікування композитом, мікроорганізмів не висівалося), гнійно-некротичних ускладнень, зниженням запального процесу у тварин після щоденного промивання порожнини абсцесу протягом 6 діб.

Вперше встановлена антибіоплівкова активність композиту НДК+ПГМГ-ГХ відносно *P. aeruginosa*: композит у концентраціях 40 та 90 мкг/мл (у перерахунку на ПГМГ-ГХ) пригнічував плівкоутворення на 93,5 та 92,1 %, призводив до руйнування 1-добової біоплівки на 74,3 і 89,8 %, а 5-добової на 72,3 і 70,4 % відповідно ($p < 0,05$).

Доповнене уявлення про можливі механізми антимікробної та антибіоплівкової дії, що полягало у збільшенні гідрофобності клітин *P. aeruginosa* на 0,9 % (у концентрації 40 мкг/мл) та 8,7 % (у концентрації 90 мкг/мл), а також пригніченні рухливості *P. aeruginosa*, обумовленої пілями IV типу (твітчінг-міграція) та зменшення площі колонії на 21,6 %.

Новизна підтверджена 2 патентами України на корисну модель.

Практичне значення одержаних результатів. На підставі проведених експериментальних досліджень обґрунтована можливість застосування композиту НДК+ПГМГ-ГХ як протимікробного та сорбційного засобу для лікування термічних та інфікованих ушкоджень шкіри, профілактики ускладнень та прискорення загоєння інфікованих ран. Після подальших доклінічних і клінічних досліджень результати роботи відкривають перспективи впровадження в медичну практику нового препарату, що виявляє протимікробні, сорбційні, протизапальні та ранозагоювальні властивості.

За результатами проведених експериментальних досліджень запропоновано спосіб визначення гострої токсичності композиту НДК+ПГМГ-ГХ (патент України на корисну модель № 124891, 2018 р.), спосіб визначення протимікробної активності композиту нанодисперсного кремнезему та полігексаметиленгуанідину гідрохлориду (патент України на корисну модель № 124891, 2018 р.), обґрунтовано інноваційні підходи до фармакологічної корекції опікових ран із використанням композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлоридом (інформаційний лист МОЗ України з проблеми «Фармакологія» № 211-2019, 2019 р.).

Результати дисертації впроваджені в навчальний процес кафедри фармакології Буковинського державного медичного університету (протокол № 2 від 30.09.2019 р.); кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова (протокол № 12 від 06.06.2019 р.); кафедри фармакології Дніпропетровської медичної академії (протокол № 3 від 21.10.2019 р.); кафедри фармакології та медичної рецептури Запорізького державного медичного університету (протокол № 18 від 10.06.2019 р.) та кафедри фармакології, клінічної

фармакології, патологічної фізіології Київського медичного університету (протокол № 2 від 10.09.2019 р.).

Особистий внесок здобувача. Постановка мети та завдань, обговорення результатів проведені разом із науковим керівником.

Дисертантом самостійно проведено патентно-інформаційний пошук, аналіз літературних джерел із досліджуваної проблеми, обґрунтовано її актуальність та обсяг необхідних експериментальних досліджень. Особисто виконано експериментальну частину, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано основні положення й висновки дисертаційної роботи, підготовлено матеріали до друку та впровадження. Співавторами статей є науковий керівник Г. В. Зайченко та фахівці, які брали участь у виконанні окремих досліджень: Н. О. Горчакова, Є. П. Воронін, О. Б. Балко. Особистий внесок дисертанта конкретизовано у списку опублікованих праць за темою дисертації. Гістологічні, біохімічні, гематологічні дослідження проведено на базі НДІ експериментальної та клінічної медицини Національного медичного університету імені О. О. Богомольця (директор – д.мед.н., проф. Л. В. Натрус). Дослідження сорбційних властивостей проведено у лабораторії модифікування поверхні оксидів Інституту хімії поверхні імені О. О. Чуйка НАН України (завідувач – д.хім.н. Воронін Є. П.). Мікробіологічні дослідження проведено у лабораторії фармакології протимікробних засобів ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» (завідувач – д.мед.н. Вринчану Н. О.). Дисертант вдячний усім науковцям за методичну та консультативну допомогу.

Апробація результатів дисертації. Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня: науково-практичній конференції з міжнародною участю «Youth Nanobiotech – 2015», молодіжному форумі з нанобіотехнологій» (Київ, 20–21 травня 2015 р.); «Annual Young Medical Scientists' Conference 2017» (Київ, 27–29 жовтня 2017 р.); X Всеукраїнській науково-практичній конференції за участю міжнародних спеціалістів з клінічної фармакології: «Сучасна клінічна фармакологія в фармакотерапії та профілактиці захворювань з позицій доказової медицини» (Вінниця, 7–8 листопада 2019 р.); II Міжнародному конгресі «Рациональне застосування антибіотиків у сучасному світі. Antibiotic resistance STOP!» (Київ, 15–16 листопада 2019 р.); науковому симпозиумі з міжнародною участю «Сучасні теоретико-практичні аспекти реалізації впровадження «Стратегії розвитку народної і нетрадиційної медицини» у первинну ланку охорони здоров'я» (Київ, 22 листопада 2019 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 15 наукових праць: 7 статей, серед яких 6 – у наукових профільних виданнях, рекомендованих МОН України, 1 – у зарубіжному науковому виданні, 2 патенти України на корисну модель, 1 інформаційний лист, 5 тез доповідей.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 172 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, 5 розділів, аналізу та узагальнення результатів, загальних висновків, списку використаних джерел та 4 додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 103 сторінки друкованого тексту. Робота

ілюстрована 39 таблицями, 25 рисунками. Список використаних джерел містить 131 найменування, з них 84 кирилицею та 47 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Композит нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлоридом був синтезований у лабораторії модифікування поверхні оксидів Інституту хімії поверхні імені О. О. Чуйка НАН України під керівництвом завідувача лабораторії, старшого наукового співробітника, д.хім.н. Вороніна Є. П. із субстанцій високодисперсного кремнезему марки А-300 (ТОВ «Орисіл-Калуш», Україна) та 20 % розчину ПГМГ-ГХ (ПФ «Терміт», Україна), які є складовими суспензії (нанодисперсний кремнезем у концентрації 50 мг/мл, ПГМГ-ГХ – 10 мг/мл).

З метою порівняльного дослідження сорбційних властивостей були використані «Силікс», порошок для оральної суспензії (ЗАТ «Біофарма», Україна), «Ентеросгель», паста для перорального застосування (ПрАТ «ЕОФ «КРЕОМА-ФАРМ», Україна); для порівняльного вивчення протимікробних та антибіоплівкових властивостей *in vitro* використовували ципрофлоксацин (лікарський препарат «Ципринол», 0,2 % розчин для інфузій), (KRKA, Словенія) та гентаміцину сульфат, 4 % розчин для ін'єкцій (ПАТ «Галичфарм», Україна); для порівняльного вивчення протимікробних та ранозагоювальних властивостей використовували хлоргексидин (лікарський препарат «Хлорексидин-КР», 0,05 % розчин для зовнішнього застосування), (ПАТ «Хімфармзавод "Червона зірка"», Україна).

Виходячи з мети і завдань дисертаційної роботи, експериментальні дослідження було виконано за нижченаведеним дизайном (рис. 1).



Рис. 1 Дизайн експериментальних досліджень

Дослідження гострої токсичності композиту НДК+ПГМГ-ГХ при внутрішньошлунковому шляху введення проводили на нелінійних білих мишах-самицях. Композит вводили у дозі 2000 мг/кг (400 мг/кг у перерахунку на ПГМГ-ГХ) за допомогою зонда (шприц на 1 мл, градуйований з ціною поділки 10 мкл, Medicare, Україна). Для перевірки токсичної дії компонентів композиту мишам одноразово внутрішньошлунково вводили ПГМГ-ГХ та нанодисперсний кремнезем у відповідних дозах. Контрольній групі вводили воду для ін'єкцій (Стефанов, 2001).

Дослідження гострої токсичності композиту НДК+ПГМГ-ГХ при нашкірному шляху нанесення проводили на нелінійних білих мишах-самицях та самцях. Композит наносили на попередньо вистрижену ділянку шкіри у дозі 2000 мг/кг (400 мг/кг у перерахунку на ПГМГ-ГХ) за допомогою шприца без використання голки (шприц на 1 мл, градуйований із ціною поділки 10 мкл, Medicare, Україна) та шпателя. Для перевірки токсичної дії компонентів композиту мишам одноразово наносили ПГМГ-ГХ та нанодисперсний кремнезем у відповідних дозах. Контрольній групі вводили воду для ін'єкцій (Стефанов, 2001).

Визначення адсорбційних властивостей композиту НДК+ПГМГ-ГХ проводили на маркерних речовинах метиленовим синім, ціанокобаламіном, сироватковим альбуміном людським та желатином при рН 6. Для визначення концентрації використовували спектрофотометричні методики. Величину адсорбції (мг/г) розраховували як відношення різниці між вихідною і рівноважною кількостями речовини у пробі до маси наважки сорбенту (Тараховский М. Л. та ін., 1993).

Протимікробна активність композиту НДК+ПГМГ-ГХ визначалася методом серійних розведень на мікроорганізмах *Escherichia coli* УКМ В-906, *Staphylococcus aureus* УКМ В-918, *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-900, *Salmonella enterica* УКМ В-921, *Klebsiella pneumoniae* УКМ В-920, *Candida albicans* УКМ Y-1918 (Некрасова Л. С., 2007).

Визначення впливу композиту НДК+ПГМГ-ГХ на формування біоплівки, а також руйнування вже сформованої біоплівки проводили в полістиролових планшетах за стандартною методикою O'Toole (G. O'Toole, 2011). Вимірювання оптичної щільності проводили на Adsorbance Microplate Reader ELx800 (BioТек, США) при довжині хвилі 630 нм. Контролем слугували інтактні культури мікроорганізмів, вирощені за тих самих умов без додавання композиту НДК+ПГМГ-ГХ або препаратів порівняння.

Вплив композиту НДК+ПГМГ-ГХ на рухову активність P. aeruginosa проводили за методикою Rashid M. H. (Rashid M. H., Kornberg A., 2000). Здатність до свіммінг-міграції вивчали з використанням 0,3 % ПС Лурія – Бертані, в яке за допомогою проколу стерильної зубочисткою вносили нічної культури бактерій, не дістаючи до дна чашки Петрі. Свормінг-міграцію вивчали з використанням 0,5 % ПС LB, в яке за допомогою проколу стерильним наконечником вносили 2 мкл нічної культури бактерій. Дослідження здатності бактерій до твітчінг-міграції проводили з використанням 1,0 % ПС LB, в яке за допомогою проколу стерильною зубочисткою (до дна) вносили нічну культуру бактерій. Досліджували зростання бактерій між агаром і чашкою Петрі з ПС LB.

Вплив композиту на гідрофобність поверхні бактеріальних клітин та їх адгезивну активність досліджували за методикою Bellon-Fontaine M.-N. (Bellon-Fontaine M.-N., Rault J., van Oss C. J., 1996). Вимірювання оптичної щільності проводили на Adsorbance Microplate Reader ELx×800 (BioTek, США) при довжині хвилі 630 нм. Контролем слугували інтактні культури мікроорганізмів, вирощені за тих самих умов без додавання композиту НДК+ПГМГ-ГХ або препаратів порівняння.

Дослідження ранозагоювальних властивостей композиту НДК+ПГМГ-ГХ на моделі термічного опіку було проведено на нелінійних білих щурах згідно з методичними рекомендаціями (Яковлева Л. В. та ін., 2013). Ефективність лікування оцінювали за місцевим проявом ранового процесу: гіперемія, набряк, епітелізація, депітелізація; зменшення площі та швидкості закриття ранового дефекту, а також за морфологічними особливостями загоєння та імунологічними показниками – цитокіновим профілем, а також показниками окисно-антиоксидантного гомеостазу.

Дослідження протимікробної активності композиту НДК+ПГМГ-ГХ на моделі абсцесу, викликаного Pseudomonas aeruginosa, було проведено на безпородних білих щурах за методиками Mölne L. та T. Dai. Ефективність лікування оцінювали за виживаністю тварин, динамікою маси тіла, зовнішніми ознаками загоєння, гематологічними показниками, аналізом крові на стерильність та морфологічними показниками (Mölne L., Tarkowski A., 2000; T. Dai et al., 2011).

Використаних у досліді тварин утримували у віварії Національного медичного університету імені О. О. Богомольця. Експерименти виконані відповідно до принципів Європейської конвенції із захисту лабораторних тварин (Страсбург, 1986 р.), Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження», наказу Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України № 249 від 01.03.2012 р. «Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах». Дотримання біоетичних норм засвідчене висновком Комісії з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень Національного медичного університету імені О. О. Богомольця (протокол № 79 від 23.04.2014 р.).

Методи статистичного аналізу. Експериментальні дані оброблено методами варіаційної статистики за допомогою комп'ютерних програм STATISTICS (Statsoft, США) та Microsoft Office Excel (Microsoft Corp., США). Дані подано у вигляді середнього арифметичного (M) і стандартної похибки (m). Для оцінки результатів досліджень та виявлення відмінностей використовували t -критерій Стьюдента, U -тест Манна – Уїтні, дисперсійний аналіз (ANOVA), ранговий критерій Крускала – Уолліса, тест Фішера. Різницю між показниками вважали значущою при рівні статистичної значимості понад 95 % ($p < 0,05$).

Результати досліджень та їх обговорення. Першим етапом дослідження композиту НДК+ПГМГ-ГХ було встановлення параметрів його токсичності. Гостру токсичність визначали за умов одноразового нашкірного нанесення композиту у дозі 2000 мг/кг (400 мг/кг у перерахунку на ПГМГ-ГХ). Встановлено, що композит можна віднести до VI класу токсичності «відносно нешкідливі речовини» (А. В. Стефанов, 2002). Показано також, що досліджувана комбінація не спричиняла загибелі піддослідних тварин та не викликала змін у поведінці тварин.

Крім вищезазначеного, для оцінки токсичного впливу композиту було обрано внутрішньошлунковий шлях введення. Отримані дані свідчать, що після внутрішньошлункового введення в максимально допустимому об'ємі 1 мл (2000 мг/кг (400 мг/кг у перерахунку на ПГМГ-ГХ)) на тварину спостерігалися незначні токсичні явища: млявість, зменшення рухової активності та тимчасова відмова від їжі впродовж 6–12 год, що пов'язано зі шлунковим дискомфортом, викликаним уведенням значної кількості речовини. Стан тварин повернувся до норми протягом кількох годин.

Після закінчення терміну спостереження (14 діб) при визначенні гострої токсичності при нашкірному нанесенні та внутрішньошлунковому введенні було проведено розтин та макроскопічний огляд внутрішніх органів тварин, при якому не виявлені ознаки інтоксикації або інші прояви патологічних процесів. За розміром, кольором, консистенцією та розташуванням внутрішні органи тварин не виходили за межі норми і не відрізнялися від внутрішніх органів мишей групи інтактного контролю. Вірогідних відмінностей між масовими коефіцієнтами внутрішніх органів дослідних та контрольних груп не виявлено.

Наступним етапом дослідження було визначення сорбційних властивостей композиту. Визначення досліджували «точково», шляхом вимірювання величини адсорбції у стандартних умовах на таких на маркерних речовинах: метиленовий синій, ціанокобаламін, сироватковий альбумін людський, желатин у слабкокислому середовищі (рН 6,0), що відповідає рН на «чистій» раневій поверхні. Було визначено, що композит проявляє виражену сорбційну активність щодо низькомолекулярних сполук (метиленовий синій) – $280,0 \pm 12,6$ мг/г, що перевищує відповідний показник для силіксу в 7,6 разу та ентеросгелю – в 11,1 разу, середньомолекулярних сполук (ціанокобаламін) – $3,6 \pm 0,2$ мг/г, перевищує подібний показник силіксу в 6 разів й ентеросгелю в 5,1 разу. Водночас композит виявляє низьку сорбційну активність щодо високомолекулярних сполук (сироватковий альбумін людський, желатин) – $26,2 \pm 1,2$ та $28,5 \pm 1,6$ мг/г відповідно, що майже у 9 разів нижче за показники силіксу та ентеросгелю ($p < 0,05$).

Проте при зниженні рН адсорбція білків збільшується майже у два рази – з $26,2 \pm 1,29$ до $50,2 \pm 2,5$ мг/г. Отже, розроблений композит проявляє більш виражену сорбційну активність при низьких значеннях рН, таких, що відповідають умовам інфекційно-запальних ран.

Наступний етап експериментів був присвячений визначенню протимікробної активності композиту щодо планктонних форм мікроорганізмів. Дослідження проводили методом серійних розведень у рідкому поживному середовищі з подальшим висівом на тверді поживні середовища. Найвищу ефективність композит продемонстрував щодо грампозитивного мікроорганізму *S. aureus* та грибка *C. albicans* – МБК/МФК склало 19,53 мкг/мл (у перерахунку на ПГМГ-ГХ). Стосовно грамнегативних мікроорганізмів ефективність була суттєво нижчою – МБК щодо *E. coli* і *S. enterica* склала 39,06 мкг/мл (у перерахунку на ПГМГ-ГХ), а стосовно *K. pneumoniae* і *P. aeruginosa* – 78,13 мкг/мл (у перерахунку на ПГМГ-ГХ).

Дослідження максимального часу збереження специфічної антимікробної дії методом дифузії у рідкі поживні показало, що композит НДК+ПГМГ-ГХ проявляє

виразну, проте нетривалу дію, зумовлену бактерицидним ефектом препарату, який зберігався протягом доби.

У подальших дослідженнях визначався вплив композиту на формування біоплівки, а також руйнування вже сформованої біоплівки (1- та 5-добова) *P. aeruginosa*. Композит застосовували у концентраціях 40 та 90 мкг/мл (у перерахунку на ПГМГ-ГХ). Мінімальна інгібуюча концентрація препаратів порівняння гентаміцину (ГЕН) та ципрофлоксацину (ЦИП) як антисиньогнійних щодо клінічного тест-штаму *P. aeruginosa* 449 складає 0,39 та 0,25 мкг/мл відповідно. У дослідженні застосовувалися концентрації препаратів порівняння, що відповідають 0,5 та 5,0 МІК.

Визначено, що композит НДК+ПГМГ-ГХ у концентраціях 40 та 90 мкг/мл пригнічував плівкоутворення *P. aeruginosa* на 93,5 та 92,1 % відповідно (рис. 2).

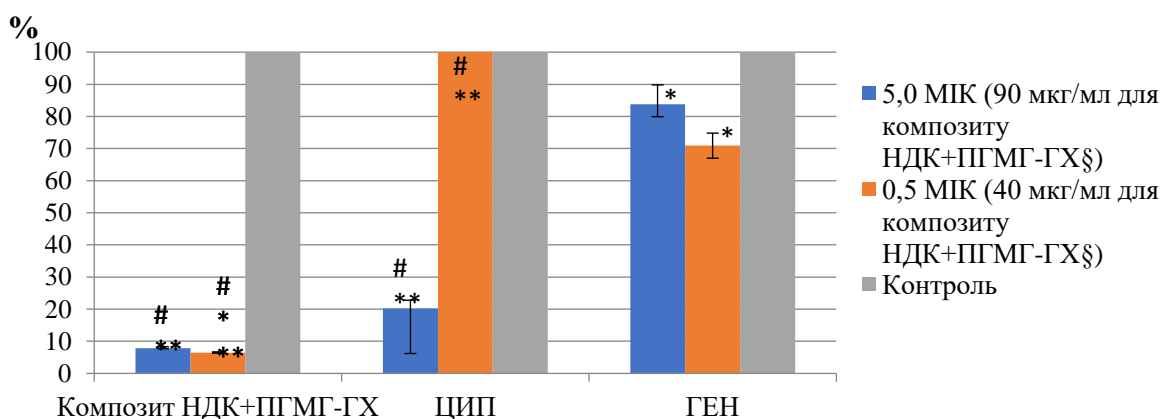


Рис. 2 Інтенсивність формування біоплівки *P. aeruginosa* 449 у присутності композиту НДК+ПГМГ-ГХ та препаратів порівняння (% утвореної біоплівки)

Примітки:

- § – у перерахунку на вміст ПГМГ-ГХ у композиті;
- * – $p < 0,05$ вірогідне зниження щодо відповідної концентрації ципрофлоксацину;
- ** – $p < 0,05$ вірогідне зниження щодо відповідної концентрації гентаміцину;
- # – $p < 0,05$ вірогідне зниження щодо інтактної культури;
- ГЕН – гентаміцин;
- ЦИП – ципрофлоксацин.

Композит НДК+ПГМГ-ГХ призводив до руйнування 1-добової біоплівки (уже сформованої) у концентраціях 40 та 90 мкг/мл у перерахунку на ПГМГ-ГХ на 74,3 і 89,8 % відповідно.

Нами було виявлено, що 5-добова біоплівка (уже сформована) є менш чутливою, порівняно з 1-добовою до дії композиту НДК+ПГМГ-ГХ, а активність композиту практично не залежить від концентрації. Так, композит НДК+ПГМГ-ГХ викликає деструкцію біоплівки у концентрації 90 мкг/мл на 70,4 %, у концентрації 40 мкг/мл – на 72,3 %.

Наступним етапом дослідження було визначення впливу композиту на рухову активність *P. aeruginosa*. Вважається, що саме здатність до рухливості є одним із факторів адгезії та утворення біоплівки на різних субстратах (Kearns D. B., 2010, Maier B., Wong G. C. L., 2015).

Композит застосовували у концентраціях 40 та 90 мкг/мл (у перерахунку на ПГМГ-ГХ). Мінімальна інгібуюча концентрація препаратів порівняння гентаміцину та ципрофлоксацину як антисиньогнійних щодо клінічного тест-штаму *P. aeruginosa* 449 складає 0,39 та 0,25 мкг/мл відповідно. У дослідженні застосовувалися концентрації препаратів порівняння, що відповідають 0,5 та 5,0 МІК.

Експериментально встановлено, що композит НДК+ПГМГ-ГХ, а також препарати порівняння (гентаміцин та ципрофлоксацин) більш виразно пригнічують рухливість синьогнійної палички, обумовлену пілями IV типу (твітчінг-міграція). Проте слід зауважити, що підвищення концентрації композиту НДК+ПГМГ-ГХ до 90 мкг/мл при дії на рух за типом твітчінг *P. aeruginosa* навпаки зменшує свою активність з переміщення клітин на абіотичній поверхні. Композит НДК+ПГМГ-ГХ або не впливав (у концентрації 40 мкг/мл), або стимулював (у концентрації 90 мкг/мл) рухливість бактерій за типом свормінг («роїння»). Серед препаратів порівняння найбільш активним виявився представник фторхінолонів – ципрофлоксацин, який пригнічував свормінг-міграцію синьогнійної палички в обох досліджуваних концентраціях порівняно з гентаміцином. При дослідженні руху за типом «плавання» (свіммінг-міграція) у *P. aeruginosa* композит НДК+ПГМГ-ГХ та препарати інгібували рухливість клітин; тут ми спостерігали дозозалежний ефект. Виходячи з вищезазначеного, можна зробити висновок, що композит НДК+ПГМГ-ГХ та препарати порівняння здійснюють негативний вплив саме на пілі IV типу, а не на джгутики мікроорганізмів.

У подальшому ми досліджували вплив композиту на гідрофобність поверхні бактеріальних клітин та їх адгезивну активність. Гідрофобність поверхні бактеріальних клітин є важливим фізичним чинником, що визначає інтенсивність адгезії мікроорганізмів до поверхні субстрату, і, як наслідок, формування біоплівки (Oliveira R. et. al., 2001, Ерошенко Д. В., 2015).

Композит застосовували у концентраціях 40 та 90 мкг/мл (у перерахунку на ПГМГ-ГХ). Мінімальна інгібуюча концентрація препаратів порівняння гентаміцину та ципрофлоксацину як антисиньогнійних щодо клінічного тест-штаму *P. aeruginosa* 449 складає 0,39 та 0,25 мкг/мл відповідно. У дослідженні застосовувалися концентрації препаратів порівняння, що відповідають 0,5 та 5,0 МІК.

Композит НДК+ПГМГ-ГХ сприяв незначному збільшенню гідрофобності клітин *P. aeruginosa* залежно від концентрації на 0,9 % (у концентрації 40 мкг/мл) та 8,7 % (у концентрації 90 мкг/мл) порівняно з інтактним контролем ($p < 0,05$). Вплив на зменшення гідрофобності клітин *P. aeruginosa* мав лише ципрофлоксацин в обох концентраціях: при 2 МІК – на 7,9 %, при 0,5 МІК – на 12,3 %. Гентаміцин у концентрації 2 МІК не впливав на гідрофобність клітин, а у концентрації 0,5 МІК збільшував на 8,5 %.

Наступний етап був присвячений дослідженню ранозагоювальних властивостей композиту НДК+ПГМГ-ГХ на моделі термічного опіку у щурів.

Моделювався термічний опік II ступеня площею 400 мм². Препаратом порівняння для лікування термічного опіку було обрано 0,05 % водний розчин хлоргексидину як антисептика, що застосовується для дезінфекції опіків, а також є хімічно спорідненим із ПГМГ-ГХ. Для підтвердження протизапальної та ранозагоювальної дії визначалися площа рани, зовнішні ознаки загоєння, вміст про- та протизапальних цитокінів і стан окисно-антиоксидантної системи у вогнищі ураження.

У тварин, яким застосовували композит НДК+ПГМГ-ГХ, з першої доби лікування спостерігалися менш виражені порівняно з групою контрольної патології та групою, що отримувала лікування хлоргексидином, набряк і гіперемія рани. Композит також сприяв прискоренню загоєння рани. Порівняно з групою тварин, які не отримували лікування, відбулося зменшення площі рани на 56 % (7 доба), на 76 % (14 доба), на 97 % (21 доба), на 99,5 % (28 доба). Також у тварин цієї групи мала місце більш виражена тенденція до зменшення поверхні рани порівняно з групою тварин, що отримували лікування хлоргексидином. Так, на 7, 14, 11 та 28 добу спостерігалось зменшення поверхні опікової рани на 47 %, 70 %, 96 % і 95 % відповідно.

Запалення, що виникає у опіковій рані, характеризується підвищенням рівня прозапальних та виникненням дефіциту протизапальних цитокінів, дисбаланс яких призводить до подовження запального процесу. Тому надалі нами визначався вміст про- та протизапальних цитокінів у вогнищі ураження.

Виявлено, що при застосуванні композиту НДК+ПГМГ-ГХ відновлювався цитокіновий профіль крові, різко порушений унаслідок термічного опіку. Композит знижував до норми концентрацію прозапального цитокіну IL-1 β в осередку до 28-ї доби. На фоні застосування композиту спостерігалось зниження вмісту IL-1 β у шкірі на 7, 14, 21 і 28 добу порівняно з препаратом порівняння хлоргексидином (на 13,5 %, 35 %, 28 %, 5 % відповідно) (рис. 3). Композит також достовірно знижував вміст прозапального цитокіну TNF- α у вогнищі ураження порівняно з хлоргексидином: на 7 добу – на 42 %, на 14 – на 26 %, на 21 – на 31 %, на 28 – на 23 % відповідно.

Композит НДК+ПГМГ-ГХ виражено підвищував рівень прозапального цитокіну IL-10 у шкірі щурів із термічним опіком (рис. 4).

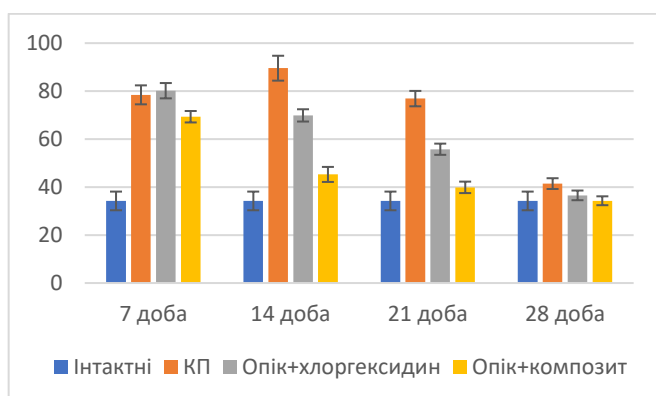


Рис. 3 Вплив композиту НДК+ПГМГ-ГХ та препарату порівняння на утримання IL-1 β (пг/г білка) у вогнищі ураження в щурів при термічному опіку ($M \pm m$, $n=6$)

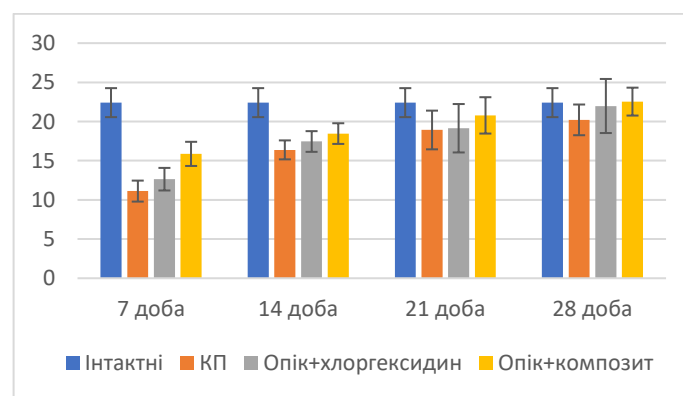


Рис. 4 Вплив композиту НДК+ПГМГ-ГХ та хлоргексидину на рівень IL-10 (пг/г білка) у вогнищі ураження в щурів при термічному опіку ($M \pm m$, $n = 6$)

При застосуванні композиту рівень ІЛ-10 у крові був вищим за показники у тварин, що отримували лікування хлоргексидином, на 36 %, 12 % і 4 % на 7, 14 та 21 добу відповідно. До 28 доби відбувалася нормалізація рівня ІЛ-10.

Виходячи з вищезазначеного, можна стверджувати, що композит НДК+ПГМГ-ГХ має виражений протизапальний ефект, про що свідчить зниження рівня ІЛ-1 β і TNF- α та збільшення ІЛ-10 у крові та шкірі протягом всього дослідження.

Термічний опік характеризується вираженим порушенням окисно-антиоксидантної системи. Нами визначалися два найбільш показові показники вільнорадикальних процесів – рівень ДК та ТБК-АП.

Композит НДК+ПГМГ-ГХ нормалізував вміст ДК і ТБК-АП у шкірі тварин уже на 14 добу. Рівень ДК і ТБК-АП знижувався порівняно з рівнем ДК і ТБК-АП у групі застосування хлоргексидину: на 7 добу – на 13,6 і 11,9 %, на 14 – на 13 і 13,5 %, на 21 – на 12,9 і 9 %, на 28 – на 11,2 і 14,5 % відповідно.

Також нами було визначена активність антиоксидантних ферментів, таких як Кат і СОД. Застосування композиту НДК+ПГМГ-ГХ сприяло більш вираженій нормалізації активності цих ферментів у шкірі порівняно з тваринами, які отримували лікування хлоргексидином. Активність Кат відновлювалася на 21 добу, а СОД – на 7 добу (рис. 5, 6).

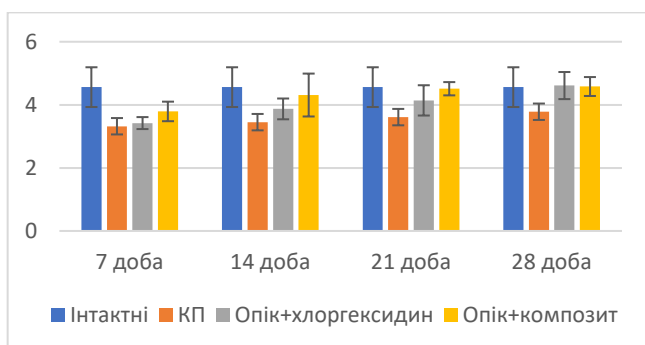


Рис. 5 Вплив композиту НДК+ПГМГ-ГХ та хлоргексидину на активність СОД (ум. од.) у вогнищі ураження ($M \pm m$, $n=6$)

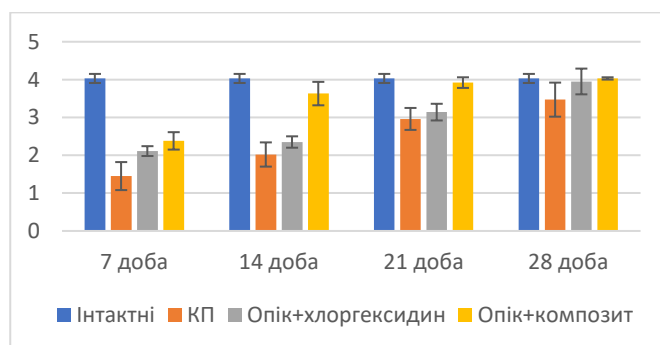


Рис. 6 Вплив композиту НДК+ПГМГ-ГХ та хлоргексидину на активність Кат (МО) у вогнищі ураження ($M \pm m$, $n = 6$)

Із вищезазначеного можна зробити висновок, що композит НДК+ПГМГ-ГХ чинить виражений вплив на нормалізацію окисно-антиоксидантного гомеостазу, що проявляється у нормалізації рівня ДК і ТБК-АП уже на 14 добу, відновленням активності Кат і СОД на 21 і 7 добу спостереження порівняно з хлоргексидином.

На 28 добу спостереження опікової травми в усіх групах спостереження спостерігалася епідермізація зони ураження. Проте у групі контрольної патології епітелізація була неповною, у епідермісі спостерігалися ділянки гіперплазії, що свідчить про вплив запального процесу. При застосуванні композиту НДК+ПГМГ-ГХ для лікування опікової травми на 28 добу спостерігалися повна епітелізація зони ураження, менший вплив запального процесу, про що свідчить рівномірне дозрівання новоствореної сполучної тканини, збільшення швидкості її епідермізації, що супроводжувалося скороченням термінів загоєння опікових ран у цілому (рис. 7).

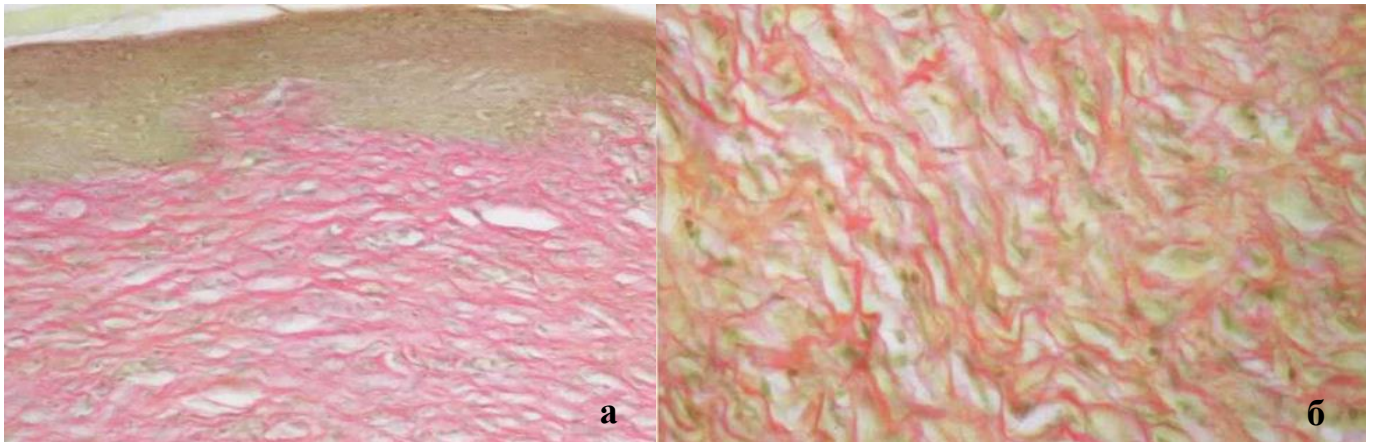


Рис. 7: а) будова шкіри у місці термічного ураження у тварин групи контрольної патології, 28 доба. Забарвлення пікрофуксином за Ван-Гізоном, $\times 400$; б) будова шкіри у місці термічного ураження у тварин, що отримували лікування композитом НДК+ПГМГ-ГХ, 28 доба. Забарвлення пікрофуксином за Ван-Гізоном, $\times 400$

Наступний етап був присвячений дослідженню антибактеріальних властивостей композиту НДК+ПГМГ-ГХ *in vivo*. Для визначення ефективності композиту НДК+ПГМГ-ГХ у лікуванні інфікованих уражень шкіри у щурів моделювався абсцес, викликаний введенням під шкіру культури *P. aeruginosa*. Препаратом порівняння для лікування термічного опіку було обрано 0,05 % водний розчин хлоргексидину як антисептика, що є хімічно спорідненим з ПГМГ-ГХ. Для підтвердження ефективності лікування визначалися виживаність тварин, динаміка маси тіла, зовнішні ознаки загоєння, аналіз крові на стерильність та морфологічні показники.

На 5 добу після формування абсцес розкривали і щодня промивали композитом НДК+ПГМГ-ГХ. Уже на 2 добу лікування гнійний процес було локалізовано, а на 5-ту зовнішньо спостерігалися ознаки початку загоєння – зменшення набряку порівняно з групою хлоргексидину та початок утворення струпа.

Оскільки абсцес здатний перейти у генералізовану інфекцію, що спричиняє погіршення стану тварин та зниження їх маси, нами була досліджена динаміка маси тіла щурів, які отримували лікування композитом НДК+ПГМГ-ГХ. Протягом експерименту не відбувалося загибелі тварин, проте їх маса знижувалася, що є свідченням погіршення загального стану. У групі тварин, які отримували лікування композитом, спостерігався більш виражений, порівняно з хлоргексидином, позитивний вплив на динаміку маси тіла щурів, що свідчить про більшу антимікробну активність та наявність протизапальної дії, а також відсутність генералізованої інфекції.

Щоб визначити наявність генералізованої інфекції, нами після виведення тварин з експерименту на 12 добу було проведено дослідження крові на стерильність. З крові тварин групи контрольної патології та тварин, які отримували лікування хлоргексидином, висівалися мікроорганізми – $3,4 \times 10^4$ КУО/см³ та $1,1 \times 10^4$ КУО/см³, що свідчить про розвиток генералізованої інфекції. З проб крові тварин, які отримували лікування композитом, мікроорганізмів не висівалося, що свідчить про високу антимікробну активність композиту.

Для визначення процесу загоєння проводилося морфологічні дослідження. У тварин із нелікованим абсцесом спостерігалися ознаки активного запального процесу, а також скупчення лейкоцитів у прилеглих до ділянки абсцесу зон.

У тварин, яким порожнину абсцесу промивали композитом НДК+ПГМГ-ГХ протягом 6 діб, зона некрозу значно зменшувалася, спостерігалось виражене пригнічення запального процесу. набряк у прилеглих ділянках був незначним. Серед гістіоцитарних клітин навколо абсцесу з'являлися фібробласти, тканинні базофіли. У капсулі абсцесу добре видимі колагенові волокна. Кровоносні судини проростали до центральних ділянок інфекційного ураження. Там також знаходили і фібробласти. Це свідчить про організацію уражених ділянок та виразну протимікробну і протизапальну активність композиту НДК+ПГМГ-ГХ (рис. 8).

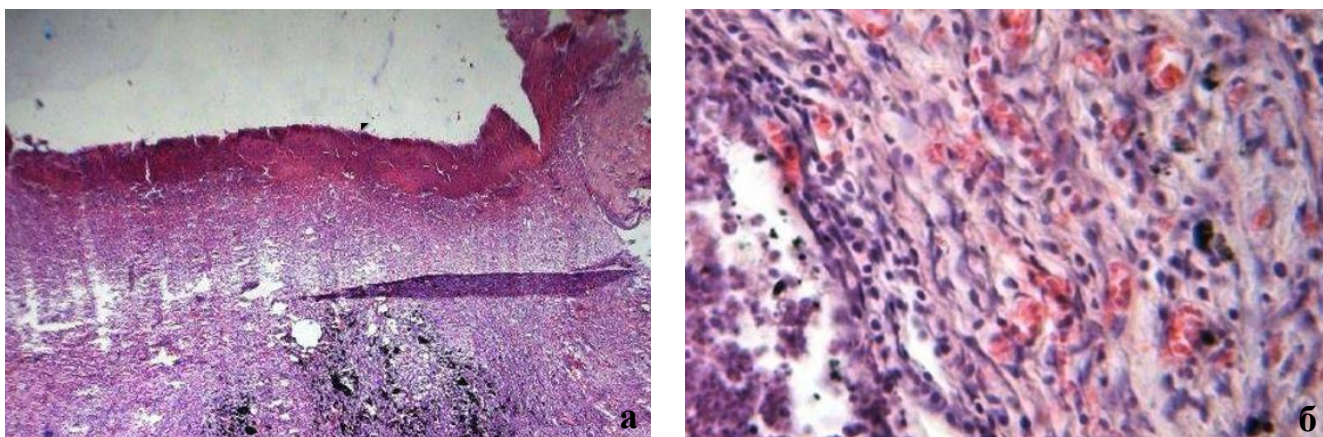


Рис. 8: а) мікрофотографія капсули нелікованого абсцесу. Забарвлення: гематоксилін-еозин, збільшення $\times 200$; б) мікрофотографія капсули абсцесу, який промивали композитом НДК+ПГМГ-ГХ. Забарвлення: гематоксилін-еозин, збільшення $\times 200$

Отже, результати дисертаційної роботи підтверджують, що композит НДК+ПГМГ-ГХ (НДК у концентрації 50 мг/мл, ПГМГ-ГХ – 10 мг/мл) належить до відносно нешкідливих речовин при нашкірному шляху нанесення, володіє вираженою сорбційною та протимікробною активністю, попереджає формування біоплівки та руйнує вже сформовану біоплівку, впливає на рухливість та адгезивну здатність мікроорганізмів; має протизапальну та ранозагоювальну дію, що підтверджено результатами досліджень на моделі термічного опіку та підшкірного гнійного абсцесу, викликаного *P. aeruginosa*. Усе вищевикладене є підставою для подальших доклінічних та клінічних досліджень композиту НДК+ПГМГ-ГХ з метою розширення асортименту вітчизняних лікарських засобів для лікування термічних та інфікованих уражень шкіри.

ВИСНОВКИ

На сьогодні лікування опікових ран є важливою медико-соціальною проблемою.

У дисертаційній роботі наведено експериментальне обґрунтування й нове рішення актуального наукового завдання, спрямованого на підвищення ефективності фармакотерапії термічних та інфікованих уражень шкіри шляхом використання

нового композиту НДК+ПГМГ-ГХ, які одночасно виявляють сорбційний, протимікробний, антибіоплівковий, протизапальний та ранозагоювальний ефекти.

1. За результатами вивчення гострої токсичності встановлено, що композит НДК+ПГМГ-ГХ у дозі 2000 мг/кг (400 мг/кг у перерахунку на ПГМГ-ГХ) належить до IV класу токсичності «малотоксичні речовини» при внутрішньошлунковому введенні та VI класу токсичності «відносно нешкідливі речовини» при нашкодженні (Сидоров К. К., 1973).

2. Доведено виражену сорбційну активність композиту НДК+ПГМГ-ГХ відносно низькомолекулярних сполук (метиленовий синій) – $280 \pm 12,6$ мг/г, середньомолекулярних сполук (ціанокобаламін) – $3,6 \pm 0,2$ мг/г у слабкокислому середовищі. За умов зниження рН адсорбція високомолекулярних сполук (білків) збільшується майже у два рази – з $26,2 \pm 1,29$ до $50,2 \pm 2,5$ мг/г. Отже, розроблений композит проявляє більш виражену сорбційну активність при низьких значеннях рН, таких що відповідають умовам інфекційно-запальних ран.

3. Визначена висока протимікробна активність щодо планктонних форм мікроорганізмів. Найбільш чутливими до дії композиту НДК+ПГМГ-ГХ виявилися грамположитивні мікроорганізми та грибки – МБК *S. aureus* та МФК *C. albicans* склали 19,53 мкг/мл (у перерахунку на ПГМГ-ГХ). Найменш чутливими – грамнегативні мікроорганізми – МБК *E. coli* і *S. enterica* склали 39,06 мкг/мл; *K. pneumoniae* і *P. aeruginosa* – 78,13 мкг/мл (у перерахунку на ПГМГ-ГХ).

4. Встановлено, що композит НДК+ПГМГ-ГХ має високу антибіоплівкову активність відносно *P. aeruginosa*. У концентраціях 40 та 90 мкг/мл (у перерахунку на ПГМГ-ГХ) пригнічував плівкоутворення на 93,5 та 92,1 %, призводив до руйнування 1-добової біоплівки на 74,3 і 89,8 %, а 5-добової на 72,3 і 70,4 % відповідно ($p < 0,05$).

5. Підтверджено, що термічний опік супроводжується запальними реакціями (підвищення рівня прозапальних цитокінів – ІЛ-1 β , TNF- α , зниження рівня протизапальних цитокінів – ІЛ-10) та порушення окисно-антиоксидантної системи (підвищення рівня ДК та ТБК-АП, зниження активності антиоксидантних ферментів Кат і СОД). Проведення терапії композитом НДК+ПГМГ-ГХ приводило до нормалізації цитокінового профілю та відновлення стану окисно-антиоксидантної системи, що свідчить про виражену протизапальну активність композиту НДК+ПГМГ-ГХ.

6. Планіметричними дослідженнями підтверджено скорочення термінів загоєння опікової травми при застосуванні композиту НДК+ПГМГ-ГХ – на 28 добу експерименту зменшення площі рани складало 99,5 %, проти 89 % у тварин, яких лікували хлоргексидином. На 28 добу експерименту в усіх досліджуваних групах опікова рана повністю вкривалася новоствореним епітелієм, місцями виявлялися вогнища його дистрофії та гіперплазії. Проте у групі тварин, що отримували лікування композитом НДК+ПГМГ-ГХ, подібні деструктивно-проліферативні зміни не спостерігалися.

7. Доведена протимікробна, протизапальна та ранозагоювальна активність композиту НДК+ПГМГ-ГХ у лікуванні тварин із гнійним абсцесом, викликаним *Pseudomonas aeruginosa*, що підтверджується нормалізацією маси тіла на 10 добу спостереження (у контролі залишалася зниженою на 13 %) ($P < 0,05$), відсутністю

генералізованої інфекції (з проб крові тварин, що отримували лікування композитом НДК+ПГМГ-ГХ не висівалися мікроорганізми) та морфологічними показниками – на 12 добу лікування була відсутня зона некрозу, спостерігалось виражене пригнічення запального процесу, набряк у прилеглих до абсцесу ділянках був незначним, відбувалося проростання кровоносних судин до центральних ділянок інфекційного ураження, спостерігалися колагенові волокна, що свідчить про організацію уражених ділянок.

8. Отримані результати є підґрунтям для цілеспрямованої розробки комбінованого топічного лікарського препарату з мультимодальною дією, що включає сорбційну, протимікробну, антибіоплівкову, протизапальну і ранозагоювальну активності та проведення подальших поглиблених преклінічних та клінічних досліджень з метою розширення асортименту вітчизняних лікарських засобів для лікування термічних та інфікованих уражень шкіри.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Дорошенко А. І. Вивчення гострої токсичності композиту високодисперсного кремнезему та полігексаметиленгуанідину гідрохлориду. *Фармацевтичний журнал*. 2017. № 2. С. 69–76.

2. Дорошенко А. И. Исследование токсичности высокодисперсного кремнезема, полигексаметиленгуанидина гидрохлорида и их композита при однократном пероральном введении самцам мышей. *Рецепт*. 2018. Т. 21. № 1. С. 42–48.

3. Дорошенко А. І., Балко О. Б., Воронін Є. П., Дорошенко А. М., Зайченко Г. В. Антимікробна активність *in vitro* нанодисперсного кремнезему і композиту полігексаметиленгуанідину гідрохлориду для лікування місцевих інфекцій (англ.). *Клінічна фармація*. 2019. Т. 23, № 1. С. 30–36. (Особистий внесок: аналіз літератури, участь у розробці дизайну та проведенні експерименту; участь у зборі, аналізі та інтерпретації даних; узагальнення результатів; написання та підготовка статті до друку).

4. Дорошенко А. І., Зайченко Г. В., Горчакова Н. О. Порівняльні дослідження адсорбуючих властивостей кремнійвмісних сорбентів // *Фітотерапія : часопис*. 2019. № 2. С. 24–29. (Особистий внесок: аналіз літератури, участь у розробці дизайну та проведенні експерименту; участь у зборі, аналізі та інтерпретації даних; узагальнення результатів; написання та підготовка статті до друку)

5. Doroshenko A., Gorchakova N., Zaychenko G. Effect of a nanodispersion silica composite with polyhexamethylene guanidine hydrochloride on immunological indicators and indicators of oxidation and antioxidant homeostasis in rats with thermal burn. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2019. № 4 (20). С. 45–52. (Особистий внесок: аналіз літератури, участь у розробці дизайну та проведенні експерименту; участь у зборі, аналізі та інтерпретації даних; узагальнення результатів; написання та підготовка статті до друку).

6. Дорошенко А. І., Зайченко Г. В., Горчакова Н. О.. Вплив композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлоридом на рівень

метаболітів азоту у щурів з неінфікованим термічним опіком. *Фітотерапія : часопис*. 2019. № 3. С. 10–14. (Особистий внесок: аналіз літератури, участь у розробці дизайну та проведенні експерименту; участь у зборі, аналізі та інтерпретації даних; узагальнення результатів; написання та підготовка статті до друку).

7. Дорошенко А. І., Зайченко Г. В., Горчакова Н. О. Вплив композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлоридом на швидкість та морфологічні показники загоєння опікових ран. *Фітотерапія : часопис*. 2020. № 1. С. 8–11. (Особистий внесок: аналіз літератури, участь у розробці дизайну та проведенні експерименту; участь у зборі, аналізі та інтерпретації даних; узагальнення результатів; написання та підготовка статті до друку).

8. Спосіб визначення гострої токсичності композиту нанодисперсного кремнезему та полігексаметиленгуанідину гідрохлориду: пат. на корисну модель Україна № 124891 U / І. С. Чекман, Є. П. Воронін, А. І. Дорошенко, А. М. Дорошенко; заявл. 16.11.2017 ; опубл. 24.04.2018, Бюл. № 8.

9. Спосіб визначення протимікробної активності композиту нанодисперсного кремнезему та полігексаметиленгуанідину гідрохлориду : пат. на корисну модель Україна № 124890 U / І. С. Чекман, Є. П. Воронін, А. І. Дорошенко, А. М. Дорошенко; заявл. 16.11.2017 ; опубл. 24.04.2018, Бюл. № 8.

10. Гребельник А. І. Дослідження гострої токсичності композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлоридом // Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Youth Nanobiotech – 2015. Молодіжний форум з нанобіотехнологій», 20–21 трав. 2015 р., м. Київ, Україна. *Український науково-медичний молодіжний журнал*. Спецвипуск № 2 (87). – С. 119–120.

11. Дорошенко А. І., Зайченко Г. В., Горчакова Н. О. Дослідження гострої токсичності композиту нанодисперсного кремнезему та полігексаметиленгуанідину гідрохлориду. *Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів»*. У 2 т., 14–15 берез. 2019 р., м. Харків, Україна. Харків, 2019. Т. 2. С. 87–88.

12. Дорошенко А. І., Зайченко Г. В. Дослідження протимікробної дії композиту нанодисперсного кремнезему та полігексаметиленгуанідину гідрохлориду. *Матеріали III Всеукраїнської науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю «Нанотехнології і наноматеріали у фармації та медицині»*. 19 квіт. 2019 р., м. Харків, Україна. Харків, 2019. С. 30.

13. Doroshenko A., Gorchakova N., Zaychenko G. V. Determination of the median lethal dose of highly dispersed silica and polyhexamethylene guanidine hydrochloride composite, 2019, *Proceedings of the VII International Conference of European Academy of Sciences & Reserch*, 2019, April – May, Bonn, Germany.

14. Дорошенко А. І., Зайченко Г. В., Горчакова Н. О., Суворова З. С., Визначення вивільнення полігексаметиленгуанідину гідрохлориду з композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлоридом, *Матеріали науково-практичної інтернет-конференції «Актуальні питання клінічної фармакології та клінічної фармації»*, 22–23 жовт. 2019 р., м. Харків, Україна. Харків, 2019. С. 302–303.

15. Зайченко Г. В., Дорошенко А. І., Горчакова Н. О., Воронін Є. П. Інноваційні підходи до фармакологічної корекції опікових ран з використанням композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлоридом: *Інформаційний лист про нововведення в сфері охорони здоров'я № 211* – 2019. Укрмедпатентінформ МОЗ України. Випуск 4 з проблеми «Фармакологія». К., 2019 р. 4 с.

АНОТАЦІЯ

Дорошенко А. І. Сорбційна та протимікробна ефективність композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлоридом. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. – Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків, 2021.

Дисертація присвячена теоретичному та експериментальному обґрунтуванню доцільності розробки нового комбінованого лікарського засобу, що володітиме сорбційними та протимікробними властивостями – композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлоридом. Безпека композиту оцінена у дослідженнях гострої токсичності за умов внутрішньошлункового та нашкірного шляху введення. Доведені сорбційна, протимікробна активність композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлоридом, вплив на формування та руйнування вже сформованої біоплівки, рухливість та фактори адгезії мікроорганізмів. Визначені протизапальні та ранозагоювальні властивості на моделі термічного опіку та протимікробна активність на моделі гнійного абсцесу. Одержані експериментальні дані свідчать про доцільність розробки лікарських засобів із комбінованим складом сорбенту та дезінфектанту для лікування термічних та інфікованих уражень шкіри.

Ключові слова: нанодисперсний кремнезем, полігексаметиленгуанідину гідрохлорид, антимікробна активність, біоплівки, рагозагоювальна активність, сорбційна активність, термічний опік, гнійна рана.

АННОТАЦИЯ

Дорошенко А. И. Сорбционная и протимикробная эффективность композита нанодисперсного кремнезема с полигексаметиленгуанидина гидрохлорида. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.03.05 – фармакология. – Национальный фармацевтический университет МЗ Украины, Харьков, 2021.

Диссертация посвящена теоретическому и экспериментальному обоснованию целесообразности разработки нового комбинированного лекарственного средства, имеющего сорбционные и протимикробные свойства – композита нанодисперсного кремнезема с полигексаметиленгуанидина гидрохлоридом. Безопасность композита оценена в исследованиях острой токсичности при внутрижелудочном и накожном

пути введения. Доказаны сорбционная, протимикробная активность композита нанодисперсного кремнезема с полигексаметиленгуанидина гидрохлоридом, влияние на формирование и разрушение уже сформированной биопленки, подвижность и факторы адгезии микроорганизмов. Определены противовоспалительное и ранозаживляющее свойства на модели термического ожога и протимикробная активность на модели гнойного абсцесса. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о целесообразности разработки лекарственного средства с комбинированным составом сорбента и дезинфектанта для лечения термических и инфицированных поражений кожи.

Ключевые слова: нанодисперсный кремнезем, полигексаметиленгуанидина гидрохлорид, антимикробная активность, биопленки, ранозаживляющая активность, сорбционная активность, термический ожог, гнойная рана.

SUMMARY

Doroshenko A. I. Sorption and antimicrobial efficacy of composite of nanodispersed silica with polyhexamethylene guanidine hydrochloride. – As a manuscript.

The thesis for a candidate degree in pharmaceutical sciences in speciality 14.03.05 «Pharmacology». – National University of Pharmacy of Ministry of Healthcare of Ukraine, Kharkiv, 2021.

The thesis is dedicated to theoretical and experimental substantiation of an expediency of development of a new combined drug with sorption and antimicrobial properties – a composite of nanodispersed silica with polyhexamethyleneguanidine hydrochloride.

In determining the acute toxicity of the composite NDS+PGMG-HC, it was found that when applied topically at a dose of 2000 mg/kg with a content of PGMG-HC 20 % composite classified as toxicity class VI (according to Sidorov K. K.) – relatively harmless substances, and at intragastric administration in a dose of 2000 mg/kg with the content of NDS+PGMG-HC of 20 % – to the IV class of toxicity – low-toxic substances.

Proved significant sorption activity of the composition NDS+PGMG-HC relative to low molecular weight compounds (methylene blue) – 280 ± 12.6 mg/g, medium molecular weight compounds (cyanocobalamin) – 3.6 ± 0.2 mg/g in a weakly acidic environment. Under conditions of decreasing the level of adsorption, the pH of macromolecular compounds (proteins) increases almost twice from 26.2 ± 1.29 mg/g to 50.2 ± 2.5 mg/g.

High antimicrobial activity against planned forms of microorganisms is determined. The most sensitive to the composition of NDS+PGMG-HC were gram-positive microorganisms and fungi – MBC *S. aureus* and MFC *C. albicans* was 19.53 µg/ml (in terms of PGMG-HC). The least sensitive – gram-negative microorganisms – MBC *E. coli* and *S. enterica* was 39.06 µg/ml, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* – 78.13 µg/ml (in terms of PGMG-HC).

It was determined that the composite NDS+PGMG-HC at concentrations of 40 µg/ml and 90 µg/ml in terms of PGMG-HC inhibited the film formation of *P. aeruginosa* by 93.5 % and 92.1 %, respectively. Led to the destruction of 1-day biofilm at concentrations of 40 µg/ml and 90 µg/ml in terms of PGMG-HC by 74.3 % and 89.8 %, respectively, and 5-day by 72.3 % and 70.4 % in accordance.

It was confirmed that thermal burns are accompanied by inflammatory reactions (increased levels of pro-inflammatory cytokines – IL-1 β , TNF- α , decreased levels of anti-inflammatory cytokines – IL-10) and violations of the oxidative-antioxidant system (increased levels of DC and TBA-AP, decreased activity antioxidant enzymes Kat and SOD). Carrying out therapy with NDS+PGMG-HC composite led to the normalization of the cytokine profile and restoration of the oxidative-antioxidant system, which indicates a pronounced anti-inflammatory activity of NDS+PGMG-HC composite.

Planimetric studies confirmed morphological data and a reduction in the healing time of burn injury with the use of NDS+PGMG-HC composite – on the 28th day of the experiment, the reduction in wound area was 99.5 %, compared with 89 % in animals treated with chlorhexidine. On the 28th day of the experiment in all study groups, the burn wound was completely covered with newly formed epithelium, in some places there were foci of its dystrophy and hyperplasia. However, in the group of animals treated with the NDS+PGMG-HC composite, such destructive-proliferative changes were not observed.

Proven antimicrobial, anti-inflammatory and wound-healing activity of the composite NDC+PGMG-HC in the treatment of animals with purulent abscess caused by *Pseudomonas aeruginosa*, which is confirmed by normalization of body weight on the 10th day of observation (in control remained reduced by 13 %) ($P < 0,05$), the absence of generalized infection (from blood samples of animals treated with NDS+PGMG-HC composite microorganisms were not sown) and morphological indicators – on the 12th day of treatment there was no area of necrosis, there was a pronounced suppression of inflammation, swelling in the areas adjacent to the abscess was insignificant, there was a germination of blood vessels to the central areas of infectious lesions, and collagen fibers were observed, which indicates the organization of the affected areas.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

IL-10 – інтерлейкін 10

IL-1 β – інтерлейкін 1 β

TNF- α – фактор некрозу пухлин α

ДК – дієнові кон'югати

Кат – каталаза

КУО – колонійутворювальні одиниці

МБК – мінімальна бактерицидна концентрація

мм² – міліметр квадратний

МФК – мінімальна фунгіцидна концентрація

НДК – нанодисперсний кремнезем

пг/г – пікограм на 1 грам

ПГМГ-ГХ – полігексаметиленгуанідину гідрохлорид

ПС – поживне середовище

СОД – супероксиддисмутаза

ТБК-АП – тіобарбітурової кислоти активні продукти