

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

БУРОВ АНДРІЙ МИКОЛАЙОВИЧ

УДК 616-001.4-002.3:616.9-092.9-085.28:612.017.1 (043.3)

ДИСЕРТАЦІЯ

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИКОРИСТАННЯ
ПОЛІКОМПОНЕНТНОГО ГЕЛЮ З НІЗИНОМ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ
ТА ТЕРАПІЇ РАНОВОЇ ІНФЕКЦІЇ**

Медицина

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії (PhD).

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ А.М. Буров

Науковий керівник: д. мед. н., професор Мішина Марина Митрофанівна

Харків – 2021

АНОТАЦІЯ

Буров А.М. Експериментальне обґрунтування використання полікомпонентного гелю з нізином для профілактики та терапії ранової інфекції. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю «Мікробіологія» – Харківський національний медичний університет МОЗ України, Харків, 2021.

Дисертація присвячена створенню засобу протимікробного впливу на мікроорганізми, збудники локалізованих гнійно-запальних процесів. У роботі обґрунтовано практичне вирішення актуального завдання – створено технологію приготування протимікробних препаратів на основі нізину та доведено його виражену антимікробну активність на основі оцінки мікробіологічних, імунологічних та морфологічних показників. Антимікробна дія препаратів вивчалася відносно *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* та *Escherichia coli*. Використовувалися чисті добові культури мікроорганізмів. Як препарати порівняння застосовували колоїдне срібло, нітрат срібла та ектерицид. Аналіз проведених досліджень показав наявність антимікробної активності у препаратів, які мають у своєму складі нізин та нітрат срібла. Решта препаратів не проявляє бактерицидних властивостей. На основі проведених досліджень був зроблений висновок, що найбільшу ефективність проявляє нізин, тому препарати на його основі були вибрані для подальших досліджень. Оптимальна концентрація нізину в препараті повинна становити $0,2 \div 0,25$ г на 10 мл суміші. Підвищення цієї концентрації економічно не доцільне.

Як основу лікувального гелю використовували карбоксиметилцелюлозу та карбопол. У ході роботи було виявлено, що розчини КМЦ, як ізольовані, так і модифіковані, не підходять для виготовлення препарату через їх низьку стабільність та незначний термін зберігання. Усі досліджувані розчини карбоксиметилцелюлози втрачали свою консистенцію

впродовж трьох місяців зберігання в звичайних умовах. Карбопол навпаки має довготривалий термін зберігання, що разом з відповідними реологічними характеристиками, робить такі композиції придатними до використання як фармакологічних комерційних препаратів. Таким чином, на основі проведених досліджень було визначено оптимальний склад протимікробної суміші: 10% NH_4OH – 5 мл; карбопол – 0,2 г; нізин – 0,05 – 0,3 г; $\text{H}_2\text{O}_{(\text{дист.})}$ – до 10 мл. Також вивчався вплив модифікаторів на антимікробну дію суміші шляхом додавання до її складу диклофенаку. Дослідження показали позитивний вплив спільної дії нізину та диклофенаку, при чому більше пригнічення спостерігається для *Pseudomonas aeruginosa*, ніж для *Staphylococcus aureus*. Крім того, у ході досліджень було з'ясовано, що пригнічення росту мікроорганізмів більш залежить не від концентрації активної речовини, а від технології отримання препарату.

Для з'ясування протимікробної дії отриманого препарату в умовах живих організмів були проведені дослідження *in vivo* на лабораторних мишах породи BALB/cJLacSto жіночої статі. Експериментально була доведена ефективність застосування антимікробних препаратів на основі карбополу з активною речовиною нізином. Лабораторні миші, яких лікували розробленим препаратом повністю видужували від зараження клінічними штамми за 16 діб лікування. Оскільки оксид нітрогену NO є однією з ключових ланок у патофізіології окисного стресу, проводили визначення показників нітросидергічного обміну – сумарних метаболітів NO, нітратів і нітритів – у сироватці крові піддослідних мишей.

Біохімічні дослідження показали, що на початку спостереження (4-а доба), в період інтенсивного розвитку запалення у сироватці крові тварин усіх дослідних груп мало місце суттєве підвищення $m\text{NO}$ більш ніж у 2 рази ($P < 0,05$). Найвищі показники були характерні для груп контрольної патології (групи тварин з інфікованими ранами, які не підлягали лікуванню).

У подальшому у мишей контрольних груп спостерігалось поступове зниження вмісту $m\text{NO}$, а наприкінці дослідження їх концентрація вірогідно

перевищувала рівень в інтактних тварин. Використання досліджуваних засобів для лікування інфікованих ран мало виражений ефект на рівень mNO . І хоча ці засоби повністю не стримували процесів нітродергічного обміну в період найбільшого прояву запалення спостережень, їх застосування дозволило знизити накопичення загальних метаболітів оксиду азоту на 8-у добу у всіх лікованих тварин.

У піддослідних тварин проводилося також вивчення концентрації в сироватці крові стабільних кінцевих метаболітів оксиду азоту – нітратів та нітритів. Результати показали, що в цілому динаміка порушень вмісту нітратів збігалася з динамікою змін рівня mNO . Вірогідне підвищення показників було притаманне лише групам контролю патології. У тварин, що піддавались лікуванню підвищення цього показника навіть у період інтенсивних запальних реакцій був суттєво меншим, ніж у контрольних групах.

Таким чином, розвиток інфекції в рані супроводжувався посиленням активності вільнорадикальних процесів в організмі, зокрема синтез оксиду азоту. Під дією медіаторів запалення відбувалося тривале підвищення синтезу оксиду азоту і його метаболітів, особливо в період інтенсивного розвитку запалення.

Через те, що цитокіни виконують імунорегуляторну функцію, збільшують термін життя імунокомпетентних клітин, а також беруть участь в регуляції апоптозу, було проведено вивчення вмісту прозапального інтерлейкіну 1β (ІЛ- 1β) і протизапального інтерлейкіну 4 (ІЛ-4) у крові піддослідних мишей.

Як показали дослідження, при інфікуванні ран у сироватці крові мишей в період активного формування запалення відзначалося суттєве підвищення вмісту прозапального ІЛ- 1β . У групах мишей з контрольною патологією рівень ІЛ- 1β зростав у 4,7 рази відносно інтактного рівня. Ріст цього показника в групах мишей, які отримували місцеве лікування, був більш стриманим і становив 2,6 – 3,3 рази, що було вірогідно менше, ніж у

контрольних групах.

Подальше загоювання ран (8 – 16-а доба) зменшувало інтенсивність утворення ІЛ-1 β , але значення показника залишалося вірогідно вищим за рівень у інтактних тварин в усі терміни спостереження.

Проведене місцеве лікування із застосуванням гелів з нізином як активною речовиною, а також мазі Левомеколь мало позитивний вплив на стан загального імунітету: рівень ІЛ-1 β у мишей усіх груп, що піддавались лікуванню, поступово зменшувався, але тільки в дослідних групах з використанням розробленого гелю наприкінці експерименту спостерігалось повне відновлення вмісту згаданого цитокіну. У групі із застосуванням гелю (зразок 8) рівень ІЛ-1 β зберігав тенденцію до підвищення, хоча значення показників були вірогідно нижчими за показники в групах контролю патології. У групі з використанням мазі Левомеколь (препарат порівняння) рівень зазначеного цитокіну також поступово знижувався, але упродовж останніх термінів спостереження (16-а доба) значення показника, хоча й були суттєво нижчі, ніж у групах контролю, але все ж таки вірогідно перевищували рівень інтактних тварин.

Динаміка показників протизапального ІЛ-4 була іншою. Базовий рівень цього цитокіну був набагато нижчий, ніж ІЛ-1 β . Навіть після утворення гнійних ран на 4-у добу інтенсивність синтезу протизапального цитокіну була в середньому лише на 36 % вища за інтактний рівень ($P < 0,05$). У подальшому рівень ІЛ-4 у групах мишей з контрольною патологією поступово зростав і на 16-у добу був вже майже вдвічі вищий за інтактний рівень.

При застосування місцевого лікування підвищення показника було більш суттєвим. Вже на 4-у добу рівень ІЛ-4 у групах тварин, які піддавались лікуванню, був вірогідно вищим не тільки за показники в інтактній групі, а й у 1,5 – 2 рази перевищував рівень у групах контролю патології. Найбільш значними були показники в групі з місцевим застосуванням гелю з нізином як діючої речовини.

Таким чином, розвиток запального процесу при утворенні інфікованих ран супроводжується суттєвими змінами стану імунних механізмів захисту організму. Це проявляється в змінах вмісту в сироватці крові цитокінів різноспрямованої дії. Синтез прозапального ІЛ-1 β з моменту утворення інфікованої рани був суттєво підвищений, що свідчило про інтенсивний перебіг гнійно-некротичного процесу; а вміст протизапального ІЛ-4 зростав поволі через підвищену активність прозапальних чинників. Імовірно, це відбувалося через місцеві зміни складу клітин крові в осередку запалення, у тому числі кількісного співвідношення популяцій і субпопуляцій лімфоцитів, розбалансування нейро-гуморальної регуляції, а також за рахунок посилення загальної імунної відповіді організму на пошкодження шкіри та бактеріальну агресію. Застосування зразку геля з нізином, а також мазі Левомеколь для проведення місцевого лікування інфікованих ран надавало позитивний ефект на нітросидергічний обмін та стан загального імунітету.

Морфологічні дослідження показали, що в ділянці введення в шкіру *Pseudomonas aeruginosa* в шкірі та підшкірній клітковині до 14-ої доби експерименту утворилась інфікована рана з ознаками репаративного процесу у вигляді новоутворення та дозрівання грануляційної тканини, тобто переважала друга фаза ранового процесу. Гістохімічно в фібробластах і ендотеліоцитах спостерігаються інтенсивні білковосинтетичні процеси, мітотична активність фібробластів. Епідермізація рани є не завершеною, новостворений епідерміс з осередковою гіперплазією та дистрофічними змінами клітин. морфологічна картина процесу загоєння рани характеризується десинхронізацією фаз запалення й регенерації, що виявляється в пролонгуванні запальних змін на тлі ослабленої макрофагальної реакції і розладів системи мікроциркуляції. Одночасно відбувається гальмування процесів репарації, що може призводити до затримки загоєння рани.

При мікроскопічному дослідженні шкіри групи тварин, які були інфіковані *Staphylococcus aureus*, виявлено, що в ділянці введення в шкірі та

підшкірній клітковині до 14-ої доби експерименту сформована гнійна рана, в якій превалюють ознаки другої фази репарації з утворенням двошарової грануляційної тканини, що знаходиться в стадії дозрівання. Є ознаки незавершеної епідермізації рани з розвитком у новоствореному епідермісі осередкових гіперпластичних та дистрофічних змін. Картина процесу загоєння рани характеризується десинхронізацією фаз запалення і регенерації, що виявляється в пролонгуванні запальних змін на тлі ослабленої макрофагальної реакції і розладів системи мікроциркуляції. Одночасно відбувається гальмування процесів репарації, що може спричинювати затримку загоєння рани.

Після лікування маззю «Левомеколь» мишей, інфікованих *Pseudomonas aeruginosa*, спостерігаються явища процесу загоєння: сформована двошарова зона регенерату, епідермізація порівняно з групою без лікування має більш поширений характер. Подібний характер перебігу спостерігається і у мишей, інфікованих *Staphylococcus aureus*: сформований двошаровий пласт грануляційної тканини, триває епідермізація зони регенерату. Однак в 40% випадків в прилеглих до регенерату тканинах виявляються ознаки проліферативного васкуліту, дрібноосередкові жирові та стромальні некрози, дрібні лейкоцитарні інфільтрати, що може сприяти гальмуванню репаративного процесу.

Після лікування нізином мишей, інфікованих *Pseudomonas aeruginosa*, превалює друга фаза загоєння, що характеризується формуванням двошарової зони регенерату та епідермізацією її периферичних відділів. Лікування нізином мишей, інфікованих *Staphylococcus aureus*, характеризується формуванням зони регенерату, що має двошарову будову, з епідермізації її периферичних відділів.

Дані морфологічного дослідження шкіри мишей, які були інфіковані *Pseudomonas aeruginosa*, показали, що при лікуванні тварин гелю з нізином та диклофенаком натрію на час закінчення експерименту репаративний процес характеризується формуванням безперервної зони регенерату і її

активною епідермізацією. При цьому в 10% випадків у новоствореному епідермісі зустрічаються слабо виражені дистрофічні зміни, що в цілому не чинить негативного впливу на перебіг репаративного процесу. Мікроскопічне дослідження препаратів шкіри мишей з інфікованою *Staphylococcus aureus* раною й лікуванням експериментальним гелем з нізином та диклофенаком натрію характеризується формуванням двошарового регенерату та перебігом процесу його епідермізації, проте в 10% випадків у прилеглих до зони регенерату тканинах зустрічаються дрібні осередки вторинних стромальних та жирових некротів, у 30% спостережень у новоствореному епідермісі виявляються дистрофічні зміни окремих клітин. Знайдені зміни, на наш погляд, суттєво не впливають на темпи процесу репарації.

Таким чином, застосування протимікробних гелевих препаратів на основі нізину, а також його композицій, модифікованих диклофенаком натрію, сприяє посиленню репаративних процесів, які мають перебіг в осередку запального процесу гнійної рани, про що свідчить мінімалізація морфологічних та біохімічних ознак запальних, дисциркуляторних та альтеративних змін.

Ключові слова: гнійно-запальні рани, біоплівки, нізин, протимікробні препарати, карбопол, нітрат срібла, резистентність, метаболіти оксиду нітрогену, мікроорганізми, цитокіни, морфологічні особливості, імунний стан.

ABSTRACT

Burov A.M. Experimental substantiation of the multicomponent gel with nisin use for prevention and treatment of wound infection. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

The dissertation on competition of a scientific degree of the biological sciences candidate on a specialty 03.00.07 "Microbiology" – Kharkiv National Medical University of the Ukraine Ministry of Health, Kharkiv, 2020.

The dissertation is devoted to creation of a means (agents) of antimicrobial influence – pathogens of localized purulent-inflammatory processes. The practical solution of the actual problem is substantiated in the work – the technology of preparation of antimicrobial drugs on the basis of nisin is created and proved its pronounced antimicrobial activity based on the assessment of microbiological, immunological and morphological parameters. The antimicrobial action of the drugs was studied in relation to *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* and *Escherichia coli*. Pure daily cultures of microorganisms were used. Colloidal silver, silver nitrate and ectericide were used as reference drugs.

Analysis of the studies showed the presence of antimicrobial activity in drugs that contain nisin and silver nitrate. The remaining drugs (other drugs) did not show bactericidal properties. On the basis of the conducted researches it was concluded that the greatest efficiency is shown by nisin, therefore, drugs based on it were selected for further research. The optimal concentration of nisin in the drug should be 0.2–0.25 g per 10 ml of mixture. Increasing this concentration is not economically feasible.

Carboxymethyl cellulose (CMC) and carbopol were used as the basis of the treatment gel. In the course of work it was found that CMC solutions, both separately and modified, are not suitable for the manufacture of the drug due to their low stability and short shelf life. Carbopol, on the other hand, had a long shelf life, which, in combination with the appropriate rheological characteristics, makes such compositions suitable for use as pharmacological commercial preparations.

Thus, on the basis of the conducted researches the optimum structure of antimicrobial mix was defined: 10% $\text{NH}_4 \text{OH}$ – 5 ml; carbopol – 0,2 g; nisin – 0,05 – 0,3 g; H_2O (dist.) – up to 10 ml.

The effect of modifiers on the antimicrobial action of the mixture by adding diclofenac to its composition was also studied. The studies have shown a positive effect of the combined action of nisin and diclofenac, with more inhibition observed for *Pseudomonas aeruginosa*, than for *Staphylococcus aureus*. In addition, studies have shown that the inhibition of the microorganisms grow depends more on the technology drug preparation, rather than the concentration of the active substance.

In vivo studies in female VALB / cJLacSto laboratory mice were performed to determine the antimicrobial activity of the drug in living organisms. The effectiveness of the use of antimicrobial drugs based on carbopol with the active substance nisin has been experimentally proven. Laboratory mice treated with the developed drug completely recovered from infection with clinical strains within 16 days of treatment.

Since nitrogen oxide - NO is one of the key links in the pathophysiology of oxidative stress, we determined the indicators of nitroxydergic metabolism - total metabolites of NO (mNO), nitrates and nitrites - in the serum of experimental mice. Biochemical studies showed that at the beginning of the observation (4th day), during the period of the inflammation intensive development in the serum of animals of all experimental groups there was a significant increase in mNO more than 2 times ($P < 0,05$). The highest rates were characteristic of control pathology groups (groups of animals with infected wounds that were not treated). Subsequently, mice in the control groups showed a gradual decrease in mNO content, but at the end of the study, the concentration of the analyte probably exceeded the level in intact animals. The use of the studied drugs for the treatment of infected wounds had a pronounced positive effect on the level of mNO. And although these drugs did not completely inhibit

the processes of nitroxydergic metabolism during the period of the greatest manifestation of inflammation, their use allowed reducing the accumulation of total nitric oxide metabolites on the 8th day in all animals to be treated.

The concentration of stable terminal metabolites of nitric oxide - nitrates and nitrites - was also studied in experimental animals. The results showed that in general the dynamics of disorders of nitrate content coincided with the dynamics of changes in the level of mNO. A probable increase in rates was characteristic only of pathology control groups. In treated animals, the increase in this indicator even in the period of intense inflammatory reactions was significantly less than in the control groups.

Thus, the development of infection in the wound was accompanied by increased activity of free radical processes in the body, in particular the synthesis of nitric oxide. Under the action of inflammatory mediators there was a long-term increase in the synthesis of nitric oxide and its metabolites, especially during the intensive development of the pathological processes.

It is known that inflammatory mediators can be cytokines that perform immunoregulatory function, increase the lifespan of immunocompetent cells, and also participate in the regulation of apoptosis. Based on this, a study of the content of cytokines in the blood of experimental mice – pro-inflammatory interleukin 1 β (IL-1 β) and anti-inflammatory interleukin 4 (IL-4).

Studies have shown that when wounds were infected during the active formation of inflammation there was a significant increase in the content of pro-inflammatory IL-1 β in the serum of mice. In control pathology groups of mice the level of IL-1 β increased 4.7 times relative to intact values. The increase in this indicator in the groups of mice receiving topical treatment was more restrained and was 2.6 - 3.3 times, which was probably less than in the control groups. Subsequent wound healing (days 8 - 16) reduced the intensity of IL-1 β formation, but the value of the indicator at all times of observation remained probably higher than the level in intact animals.

The local treatment with the use of gels with nisin as an active substance, as

well as ointments Levomekol had a positive effect on the state of general immunity: the level of IL-1 β in mice of all treated groups was gradually reduced, but only in the experimental groups using the developed gel at the experiment end there was a complete recovery of the content of this cytokine. In the gel group (sample 8) the IL-1 β content continued to increase, although the values were probably lower than the levels in the pathology control groups. In the group using Levomekol ointment (comparison drug) the level of this cytokine also gradually decreased, but in the last observation period (16th day) the value of the indicator, although they were significantly lower than in the control groups, they still probably exceeded the level of intact animals.

The dynamics of anti-inflammatory IL-4 was different. Baseline of this cytokine levels were much lower than IL-1 β . Even after the formation of purulent wounds on the 4th day, the intensity of anti-inflammatory cytokine synthesis was on average only 36% higher than the intact level ($P < 0.05$). Subsequently, the level of IL-4 in groups of mice with control pathology gradually increased and on the 16th day was almost 2 times higher than the intact level.

When using local treatment, the increase was more significant. Already on the 4th day, the level of IL-4 in the groups of animals that were treated was probably higher not only than in the intact group, but also 1.5 - 2 times higher than the level in the groups of pathology control. The most significant were in the group with topical application of gel with nisin as the active substance.

Thus, the development of the inflammatory process in the formation of infected wounds was accompanied by significant changes in the state of the body's immune defense mechanisms. This was manifested in changes in serum cytokines levels of multidirectional action. The synthesis of pro-inflammatory IL-1 β since the formation of the infected wound was significantly increased, which indicated an intense course of purulent-necrotic process; and the content of anti-inflammatory IL-4 increased slowly due to the increased activity of pro-inflammatory factors. Probably this was due to local changes in the composition of blood cells in the inflammatory focus, including the quantitative ratio of

populations and subpopulations of lymphocytes, imbalance of neuro-humoral regulation, as well as by strengthening the body's overall immune response to skin damage and bacterial aggression. The use of a sample of gel with nisin, as well as Levomekol ointment for local treatment of infected wounds had a positive effect on nitroxydergic metabolism and interleukin profile.

Morphological studies showed that in the area of introduction into the wound of *Pseudomonas aeruginosa* in the skin and subcutaneous tissue up to 14 days of the experiment formed an infected wound with signs of reparative process in the form of neoplasms and maturation of granulation tissue, ie the second phase of the wound process prevailed. Histochemically, intense protein-synthetic processes were observed in fibroblasts and endotheliocytes, and mitotic activity of fibroblasts was increased. Wound epidermization was incomplete; the newly formed epidermis was with focal hyperplasia and dystrophic cell changes. The morphological picture of the wound healing process was characterized by desynchronization of the phases of inflammation and regeneration, which was manifested in the prolongation of inflammatory changes against the background of a weakened macrophage response and disorders of the microcirculation system. At the same time there was an inhibition of repair processes, which could lead to delayed wound healing.

Microscopic examination of a group of animals infected with *Staphylococcus aureus* revealed that a purulent wound had formed in the skin and subcutaneous tissue by the 14th day of the experiment, in which signs of the second phase of repair prevailed with the formation of two-layer granulation tissue, which was in the maturing stage. There were signs of incomplete epidermization of the wound with the development of focal hyperplastic and dystrophic changes in the newly formed epidermis. Desynchronization of the phases of inflammation and regeneration, which manifested itself in the longer development of inflammatory changes, was characterized by a weakened macrophage response and disorders of the microcirculation system. Certain morphological changes in the inhibition of repair processes may be the cause of

delayed wound healing.

After treatment of wounds with Levomekol ointment in mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*, the phenomena of the healing process were observed: the formed two-layer zone of regeneration, epidermisization in comparison with the group without treatment was more common. A similar course was observed in mice infected with *Staphylococcus aureus*: formed a two-layer layer of granulation tissue, prolonged epidermis of the regenerate zone. However, in 40% of cases in the tissues adjacent to the regenerate showed signs of proliferative vasculitis, small-fat and stromal necrosis, small leukocyte infiltrates, which restrained the acceleration of the reparative process.

After gel with nisin treatment mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*, the second phase of healing prevailed, this was characterized by the formation of a two-layer zone of regenerate and epidermisization of its peripheral parts. Gel with nisin treatment of mice infected with *Staphylococcus aureus* was characterized by the formation of a regenerate zone, which had a two-layer structure of epidermization of its peripheral parts.

Data from skin morphological examination of mice infected with *Pseudomonas aeruginosa* showed that in the treatment of animals with gel with nisin and diclofenac sodium at the end of the experiment reparative process was characterized by the formation of a continuous zone of regenerate and its active epidermis. At the same time in 10% of cases in the newly formed epidermis there were weak dystrophic changes, which in general did not have a negative impact on the reparative process.

Microscopic examination of skin preparations of mice with *Staphylococcus aureus* infected wound after treatment with experimental gel with nisin and diclofenac sodium was characterized by the formation of a two-layer regenerate and the course of the process of its epidermis; however, in 10% of cases in the tissues adjacent to the regeneration zone there were small foci of secondary stromal and fatty necrosis, and in 30% of observations in the newly formed epidermis dystrophic changes in individual cells were revealed. The identified

changes did not significantly affect the pace of the reparation process.

Thus, the use of antimicrobial gel preparations based on nisin and its compositions modified with diclofenac sodium contributed to the strengthening of reparative processes, occurring in the inflammatory process of the purulent wound, as evidenced by the minimization of morphological and biochemical features of inflammatory, dyscirculatory and alternative changes.

Keywords: purulent-inflammatory wounds, biofilm, nisin, antimicrobial drugs, carboxymethyl cellulose, carbopol, silver nitrate, resistance, nitrogen oxide metabolites, microorganisms, cytokines, morphological features, immune status.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ НДР

У фахових виданнях (основні наукові результати дисертації):

(* особистий внесок дисертанта)

1. Mishyna Maryna, Burov Andrey, Vekshin Vitaliy, Grabovetskaya Evgeniya. Antibacterial effect of nisin *in vitro*. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020; №10. С. 332-338. (* - проведені дослідження антибактеріального впливу нізину в експерименті *in vitro*).
2. Mishyna M., Vekshin V., Burov A., Grabovetskaya E. Investigation of physico-chemical characteristics of carboxymethylcellulose colloidal carriers for medical preparations. *Journal of Education, Health and Sport*. 2021; №1(11). С. 202-218. (* - проведені дослідження приготування розчинів карбоксиметилцелюлози та визначення їх властивостей).
3. Mishyna Marina, Burov Andrey, Vekshin Vitaliy, Grabovetskaya Evgeniya. Evaluation of antimicrobial activity of some compounds for purulent wounds treatment. *Journal of Education, Health and Sport*. 2021; №3(11). С. 34-41. (* - проведено визначення оптимальної концентрації нізину).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

1. М.М. Мішина, А.М. Буров, В.О. Векшин. Дослідження фізико-хімічних властивостей полімерних гелевих носіїв лікарських препаратів на основі карбоксиметилцелюлози. VII Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Сучасний рух науки», Дніпро, 2019, С. 1189-1193 (*- проведені дослідження фізико-хімічних властивостей КМЦ);
2. Burov Andriy, Vekshyn Vitaliy, Grabovetskaya Evgeniya. Application Of Carboxymethylcellulose As A Carrier Of Medical Preparations For The Burn Wounds Treatment Міжнародна конференція «International Scientific Interdisciplinary Conference (ISIC) Kharkov, 18-20 September, 2019, С. 14-15 (*- проведені дослідження оптимальної концентрації КМЦ у гелі);
3. Мішина М.М., Буров А.М., Векшин В.О. Дослідження фізико-хімічних показників колоїдних носіїв лікарських препаратів на основі карбоксиметилцелюлози.. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 90-річчю акад. А.Я. Циганенка «Актуальні питання сучасної мікробіології та імунології». Харків, 2019, С. 57-61. (*- проведені дослідження залежності в'язкості гелю від концентрації КМЦ);
4. Буров А.М., Векшин В.О. Розробка медичного препарату на основі геля карбоксиметилцелюлози для лікування опікових ран. Матеріали міжвузівській конференції молодих вчених та студентів «Медицина третього тисячоліття», Харків, 2020, С. 30-31. (*- проведені дослідження зміни стабільності гелю залежно від тривалості зберігання)

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ ВИМІРУ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	22
ВСТУП.....	23
РОЗДІЛ 1 СУЧАСНИЙ ПОГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ ПРОФІЛАКТИКИ ТА ТЕРАПІЇ РАНОВОЇ ІНФЕКЦІЇ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	31
1.1 Проблема контамінації відкритих ран.....	31
1.2 Традиційні методики та препарати для лікування гнійних ран....	33
1.3 Недоліки традиційних препаратів для лікування ран.....	34
1.4 Засоби для лікування інфікованих ран, що розробляються.....	36
1.5 Препарати на основі срібла.....	37
1.6 Антимікробна дія бактеріоцинів.....	41
1.7 Основи мазей для лікування інфікованих ран.....	46
Висновки до розділу 1.....	53
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	55
2.1. Мікробіологічні методи <i>in vitro</i>	55
2.1.1. Метод вивчення затримки росту.....	55
2.1.2. Визначення оптимальної концентрації нізину.....	56
2.1.3. Приготування гелю карбоксиметилцелюлози.....	56
2.1.4. Дослідження в'язкості розчину КМЦ відносно допоміжних чинників.....	56
2.1.5. Приготування гелю на основі карбополу.....	57
2.1.6 Дослідження показників в'язкості розчину карбополу.....	57
2.2 Об'єкт та матеріали досліджень.....	57
2.2.1 Моделювання інфікованої ранової поверхні на лабораторних тваринах.....	58
2.2.2 Планометричні методи.....	59
2.3.Методи біохімічного та імуноферментного аналізу.....	61
2.3.1. Методи біохімічного аналізу.....	61

2.3.2. Методи імуноферментного аналізу.....	62
2.4. Статистична обробка результатів досліджень.....	64
2.5. Гістологічні методи аналізу.....	66
РОЗДІЛ 3. ВИВЧЕННЯ БАКТЕРИЦИДНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СРІБЛОВМІСНИХ АНТИСЕПТИКІВ ТА КОМПОЗИЦІЙ НІЗИНА В ЕКСПЕРИМЕНТІ IN VITRO.....	67
3.1 Вивчення затримки росту.....	67
3.2 Визначення оптимальної концентрації нізину.....	71
Висновки до розділу 3.....	74
РОЗДІЛ 4. ВИБІР ОСНОВИ ГЕЛІВ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ГНІЙНИХ РАН.....	76
4.1 Приготування основ мазей та дослідження їх властивостей.....	78
4.1.1 Приготування гелю карбоксиметилцелюлози.....	78
4.1.2 Дослідження показників в'язкості розчину КМЦ.....	78
4.1.3 Дослідження кислотності розчину КМЦ.....	80
4.1.4 Залежність в'язкості розчину КМЦ від температури.....	81
4.1.5 Залежність в'язкості розчину КМЦ від її концентрації.....	83
4.1.6 Зміна характеристик розчину КМЦ в залежності від тривалості зберігання.....	84
4.2. Приготування гелю на основі карбополу.....	90
4.2.1 Дослідження показників в'язкості розчину карбополу.....	91
4.2.2 Дослідження впливу температури на в'язкість розчину карбополу.....	93
4.2.3 Дослідження стабільності розчину карбополу.....	93
Висновки до розділу 4.....	94
РОЗДІЛ 5. МЕТАБОЛІЧНІ ЗМІНИ В СИРОВАТЦІ КРОВІ МИШЕЙ З ІНФІКОВАНИМИ РАНАМИ.....	96
5.1. Зміни показників нітросидергичного обміну в сироватці крові мишей при лікуванні інфікованих ран.....	96

5.2. Цитокиновий профіль в крові мишей при лікуванні інфікованих ран.....	102
Висновки до розділу 5.....	107
РОЗДІЛ 6. ВИЗНАЧЕННЯ МОРФОЛОГІЧНИХ ЗМІН ТКАНИН ОСЕРЕДКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО УРАЖЕННЯ ЗА ДІЇ ПРОТИМІКРОБНОГО ПРЕПАРАТУ З НІЗИНОМ.....	
6.1. Морфологічні дослідження шкіри мишей, інфікованих <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , з наступною терапією маззю «Левомеколь»...	110
6.2. Морфологічні дослідження шкіри мишей, інфікованих <i>Staphylococcus aureus</i> , з наступним лікуванням маззю «Левомеколь»....	112
6.3. Морфологічні дослідження шкіри мишей, інфікованих <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , терапія з використанням експериментального гелю з нізином.....	115
6.4 Морфологічні дослідження шкіри мишей, інфікованих <i>Staphylococcus aureus</i> , терапія з використанням експериментального гелю з нізином та диклофенаком натрію.....	118
6.5 Морфологічні дослідження шкіри мишей, інфікованих <i>Staphylococcus aureus</i> , терапія з використанням експериментального гелю з нізином.....	120
6.6 Морфологічні дослідження шкіри мишей, інфікованих <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , терапія з використанням експериментального гелю з нізином та диклофенаком натрію.....	123
6.7 Морфологічні дослідження шкіри мишей, інфікованих <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , контрольна група без лікування.....	126
6.8 Морфологічні дослідження шкіри мишей, інфікованих <i>Staphylococcus aureus</i> , контрольна група без лікування.....	130
6.9 Морфологічні дослідження шкіри інтактних мишей (негативний контроль).....	133
Висновки до розділу 6.....	137

РОЗДІЛ 7. АНАЛІЗ Й УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

ДОСЛІДЖЕННЯ.....	139
ВИСНОВКИ	154
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	156
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	157

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ
ВИМІРУ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

АМП – антимікробні пептиди

АТ – антимікробна терапія

ВЛІ – внутрішньолікарняні інфекції

ГЗІ – гнійно-запальні інфекції

ЛФ – левофлоксацин

КМЦ – карбоксиметилцелюлоза

МРЗС – метицилінрезистентний золотистий стафілокок

УПМ – умовно патогенні мікроорганізми

ПАР – поверхнево активні речовини

ФХ – фторхінолони

ESBL – β -лактамази розширеного спектра

НПЗ – нестероїдний протизапальний засіб

ЦОГ – циклооксигеназа

МПБ м'ясо-пептонний бульйон

ВСТУП

Неправильне та несвоєчасне лікування ран після хірургічних втручань може спричинити за собою тяжкі наслідки для організму через можливе виникнення гнійно-запальних ускладнень внаслідок мікробної контамінації [1]. У зв'язку з цим дуже важливо підібрати протимікробний лікарський засіб, застосування якого прискорює загоєння рани та дозволяє запобігти негативним наслідкам для організму. У теперішній час розроблено багато різних видів та форм лікарських препаратів, які активно застосовуються при лікуванні запальних пошкоджень. При цьому традиційні препарати разом з перевагами мають низку суттєвих недоліків. Так, основним недоліком антибіотиків є втрата активності по мірі набуття резистентності до них хвороботворних бактерій [2].

Застосування антисептичних препаратів також не є абсолютною панацеєю через їх доволі жорсткий вплив на область ранової поверхні. Перевага антисептиків полягає в неможливості набуття до них резистентності у мікроорганізмів, проте ці препарати можуть піддаватись контамінації при довготривалому використанні з однієї ємності [3].

В останні роки з'явилося багато публікацій про антисептичну дію бактеріоцинів [4–6]. Їх здатність знешкоджувати хвороботворні мікроорганізми застосовується головним чином у харчовій промисловості [7–10], проте в практичній хірургії вже давно чекають фармацевтичні препарати для ефективного лікування запальних ран [11].

У цьому плані найбільш придатним представником бактеріоцинів є нізин [12,13]. Нізин є безпечним пептидом з визнаним потенціалом для клінічного використання. За останні два десятиріччя застосування нізина набуло значного поширення в біомедицині. Дослідження показали, що нізин може запобігати зростанню стійких до ліків штамів бактерій, таких як стійкий до метициліну *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococci* та *Clostridium difficile*. Було показано, що нізин має антимікробну

активність відносно як грампозитивних, так і грамнегативних патогенів [14].

Приготування таких ліків можливе шляхом з'єднання протимікробної дії нізину, розчиненого в об'ємі гелевої основи. В якості останньої можливе використання гелеутворювачів на поліетиленоксидній основі з молекулярною вагою 400 або 1500, карбоксиметилцелюлози (КМЦ) або карбополу. Їх перевагами є низька токсичність, відсутність алергічних реакцій, водневий показник рН відповідає шкірному, можливість тривалого застосування без істотних побічних явищ, багатогранність фармакологічних властивостей, благотворна дія на організм в цілому та швидке засвоєння. Гель швидко розподіляється, практично миттєво підсихає і добре тримається на шкірі, утворюючи тонку плівку, але при цьому не закупорює пори. До того ж мазеві композиції мають пролонговану дію, проте, повне вивільнення активної речовини [15–17].

Разом з тим, відомості щодо впливу композицій полікомпонентних гелів з нізином на контаміновані мікроорганізмами рани відсутні. Створення ефективних схем використання комплексного протимікробного впливу на інфіковану рану потребує більш глибокого вивчення на експериментальних моделях *in vivo*.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана відповідно з плановою тематикою науково-дослідної роботи кафедри мікробіології, вірусології та імунології ім. проф. Д.П. Гриньова ХНМУ: (№ держреєстрації № 0118U000930 – 2017–2019 рр.); «Експериментальне обґрунтування застосування комплексу протимікробних засобів на підставі визначення особливостей мікробіологічних властивостей збудників гнійно-запальних захворювань» (№ держреєстрації: 0120U102569 КПКВК 2301020 – прикладна, 2020 – 2024 рр.).

Мета і завдання дослідження

Метою дослідження є розробка полікомпонентного гелю на основі нізину та визначення його протимікробного впливу на експериментальні інфіковані рани.

Для досягнення мети були поставлені наступні **завдання**:

1. Дослідити чутливість провідних мікроорганізмів, збудників ранових інфекцій, до антимікробних препаратів та до експериментального полікомпонентного гелю на основі нізину.

2. Провести експериментальне дослідження з мікробіологічним обґрунтуванням доцільності застосування полікомпонентного гелю на основі нізину для лікування інфікованих ран.

3. На експериментальних моделях інфікованих ран провести дослідження тривалості загоєння запальної інфікованих ран дією на них полікомпонентного гелю на основі нізину.

4. Вивчити імунологічні та морфологічні зміни тканин інфікованих ран експериментальних тварин після дії полікомпонентного гелю на основі нізину.

5. Розробити схему комплексного застосування полікомпонентного гелю на основі нізину.

Об'єкт дослідження – інфіковані рани змодельовані на експериментальних тваринах.

Предмет дослідження – штами мікроорганізмів; лабораторні показники; антимікробні засоби; полікомпонентний гель на основі нізину.

Методи дослідження. Мікробіологічні (бактеріологічні, мікроскопічні, серологічні, ПЛР, РІФ), імунологічні (ІФА, дослідження фагоцитозу, формування нейтрофільних пасток), морфологічні, інформаційно-аналітичні, статистичні.

Матеріали та методи:

У дисертаційних дослідженнях для моделювання експериментальної рани *in vivo* використовувались лабораторні миші лінії BALB/cJLacSto. На них було сформовано модель інфікованої рани. Експерименти на тваринах проводилися відповідно до принципів Женевської конвенції 1985 року про «Міжнародні принципи біомедичних досліджень з використанням тварин» та Гельсінкської декларації 2000 року про гуманне ставлення до тварин. Після

попереднього видалення волосяного покриву, перед нанесенням ранового дефекту тваринам була проведена інфільтраційна анестезія шляхом підшкірного введення лідокаїну. Після цього лабораторним мишам за допомогою інструменту для панч-біопсії було нанесено рану на дорсальну поверхню тіла з наступним внесенням 1-2 мл бактеріальної суспензії штамів хвороботворних мікроорганізмів. Забір матеріалу для дослідження здійснювали через 72 години після проведення процедури з моделюванням інфікованої рани.

Для дослідження лікувального ефекту було проведено розробку проти-мікробного полікомпонентного гелю, в якості активної речовини якого був використаний нізин. Для виявлення антимікробного впливу даного гелю проводили його нанесення на зовнішню уражену ділянку шкіри один раз на добу, починаючи з третьої доби експерименту.

Виходячи з того, що рана інфікована асоціаціями мікроорганізмів, проведенні засіви на агар Мюллера-Хінтона, для визначення їх чутливості методом колодязів до впливу нізину.

Тестування мікроорганізмів на здатність утворювати біоплівки проводились у плоскодонних полістиролових планшетах. Оптична щільність сформованих біоплівок вимірювалась на ридері «Multiskan EX 355».

Експериментальну частину досліджень з відтвореною моделлю запальної рани, здійснювали через 3 доби після початку експерименту на тваринах, в ході якої було випробувано розроблений полікомпонентний гель. Дослідження проводили опираючись на результати, отримані в ході мікробіологічних, імунологічних, морфологічних та спектральних випробувань.

Стан імунної відповіді оцінювався кожну 5 добу експерименту за допомогою імунологічних методів із визначенням фагоцитарного процесу та здатністю до формування нейтрофільних позаклітинних пасток.

При обробці результатів були використані методи параметричної статистики із застосуванням програми «Statistica», «Biostat», «Microsoft Excel» та «Statgraphics Centurion »за допомогою персонального комп'ютера.

Умови для вирішення поставлених у дослідженні задач.

Поставлені задачі було виконано завдяки забезпеченню необхідними умовами:

Науковою базою є Харківський національний медичний університет: кафедра мікробіології, вірусології та імунології ім. проф. Д.П. Гриньова, центральна науково-дослідна лабораторія.

Метрологічною базою для забезпечення достовірності результатів та репрезентативності висновків є застосування кількісних методів оцінки, засобів та пристроїв, стандартизованих і сертифікованих УкрНДІ стандартизації, метрології та сертифікації.

Наукова новизна дисертаційної роботи.

Вперше експериментально доведений позитивний протимікробний вплив бактеріоцину нізину проти *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosae* в умовах *in vitro*.

Доповнено наукові дані щодо застосування мазей з протимікробними властивостями, а саме – за допомогою дослідів *in vivo* показано, що для лікування контамінованих відкритих ран найбільш ефективним способом доставки нізину в осередок інфікування є його нанесення на поверхню рани у вигляді м'якої лікарської форми.

Отримали подальший розвиток наукові положення щодо вдосконалення методів створення основ для антибактеріального гелю на підставі проведених реологічних, структурно-механічних та фізико-хімічних досліджень, які показали, що для створення м'яких лікарських форм з активною речовиною нізином найбільш придатними є гідрофобні гелеві композиції на основі карбополу.

Вперше визначені оптимальні параметри та розроблена технологія приготування антибактеріального гелю для лікування інфікованих ран на основі карбомеру карбополу з активною речовиною у вигляді бактеріоцину нізину.

На основі поглибленого вивчення протимікробних властивостей

протимікробних гелів показано позитивний вплив додавання до складу розробленої антимікробної композиції комерційного НПЗ «Діклофенак», шляхом зменшення запального процесу у рані.

Вперше експериментально на підставі проведених дослідів *in vivo* доведена ефективність застосування розробленої гелевої композиції в процесі лікування запальних ран; показано пригнічення розвитку хвороботворних *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosae*, сформована тимчасова полімерна захисна оболонка поверхні шкіри полікомпонентним гелем з антимікробною дією, що сприяє попередженню інфікування, зумовлює прискорення регенеративних процесів зменшення кількості рубцюватої тканини та прискорює епітелізацію рани, що призводить до скорочення строків лікування хворих в стаціонарах та зниженню ліжко-місць.

Ефективність роботи.

Медична: застосування полікомпонентного гелю на основі нізину для лікування інфікованих ран призводить до швидкого одужання пацієнтів та зменшенню імовірності розвитку ускладнень. Запропоновану методику можливо застосувати для лікування та формування тимчасового ранового покриття для різних видів відкритих ран.

Соціальна: використання результатів роботи в практичній охороні здоров'я після реєстрації нового медичного препарату дозволить скоротити строки лікування, знизити інвалідність, усунути летальність.

Економічна: запропонована методика забезпечить зниження державних витрат на лікування і реабілітацію хворих та зменшення терміну перебування хворого в стаціонарі.

Практичне значення отриманих результатів.

Застосування розробленого полікомпонентного гелю на основі нізину при лікуванні інфікованих ран призводить до пригнічення етіологічних чинників запального процесу, відновлення показників місцевого імунітету, нормалізації місцевого гомеостазу, адсорбції продуктів мікробного та

тканинного розпаду, підсушування, забезпечення активації обмінних процесів в тканинах, стимуляції репаративних процесів. Сукупність даних чинників забезпечує скорочення строків лікування, зниження числа інвалідизації і летальності, а також прискорення реабілітації та скорочення перебування хворого в стаціонарі. Можливе використання полікомпонентного гелю основі нізину для лікування інших відкритих та операційних ран.

Результати дисертації впроваджено в наукову роботу кафедри мікробіології, вірусології та імунології ім. проф. Д. П. Гриньова Харківського національного медичного університету, кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного фармацевтичного університету (м. Харків), кафедри загальної та клінічної імунології й алергології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, кафедри мікробіології.

Особистий внесок здобувача.

Дисертаном самостійно проаналізовано наукову літературу за темою дисертаційної роботи, проведено патентно-інформаційний пошук, визначено мету і завдання дослідження, обґрунтовано та сформульовано основні висновки роботи. У співавторстві з науковим керівником д. мед. н., професоркою Мішиною М. М. та к.т.н. Векшиним В.О. проведено експериментальні дослідження щодо впливу нізину на хвороботворні мікроорганізми *in vitro*. У співавторстві з д.фарм.н., ст.н.с. Мартиновим А.В. приготовано лікувальний гель на основі карбополу із активною речовиною у вигляді нізину. У співавторстві з к.мед.н, доцентом Наумовою О.В. змодельована запальна рана *in vivo* та проведені експериментальні дослідження умов її загоєння з визначенням морфологічних змін тканини осередку запалення. У співавторстві з к.б.н. Абрамовою Л.П. проведені біохімічні дослідження з визначення показників нітросидергичного обміну та цитокінового балансу. Самостійно визначена оптимальна концентрація нізину у складі лікувального гелю; написані глави дисертації та сформульовано висновки.

Апробація результатів дисертації.

Результати дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на: VII Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Сучасний рух науки» (Дніпро, 2019); Міжнародній конференції «International Scientific Interdisciplinary Conference (ISIC) (Харків, 2019); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю присвяченій 90-річчю акад. А.Я. Циганенка «Актуальні питання сучасної мікробіології та імунології» (Харків, 2019); Міжвузівській конференції молодих вчених та студентів «Медицина третього тисячоліття» (Харків, 2020).

Публікації

За результатами дисертації опубліковано 7 наукових праць, з них 3 – у наукових фахових журналах іноземних держав, 4 – у збірниках конференцій та конгресів.

Структура та обсяг дисертації.

Дисертацію викладено українською мовою, загальним обсягом 176 сторінок машинописного тексту, з яких 134 сторінки займає основний текст. Дисертація складається зі змісту, переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, опису матеріалу та методів дослідження, чотирьох розділів власних досліджень, аналізу й узагальнення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій, списку використаної літератури. Бібліографія містить 183 джерел. Роботу ілюстровано 11 таблицями, 11 формулами та 31 рисунком.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНИЙ ПОГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ ПРОФІЛАКТИКИ ТА ТЕРАПІЇ РАНОВОЇ ІНФЕКЦІЇ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Проблема контамінації відкритих ран

В даний час особливу заклопотаність в сфері практичної медицини викликають інфекції, що призводять до розвитку гнійно-запальних захворювань відкритих ран. Незважаючи на прийняття санітарно-гігієнічних заходів, ймовірність контамінації лікарняних приміщень залишається досить високою. У цьому плані особливий ризик представляють зони, де знаходяться пацієнти з пошкодженим шкірним покривом, тобто операційні, палати інтенсивної терапії, опікові відділення та ін. У відділеннях реанімації та палатах інтенсивної терапії ризик розвитку інфекційних ускладнень у хворих в 5–10 разів вище, ніж у хворих у відділеннях загального профілю. Інфекції в реанімації складають 25 % від всіх госпітальних інфекцій. За даними міжнародних багатоцентрових досліджень, середня частота госпітальних інфекцій в лікувальних установах становить 5–10 %, а у палатах інтенсивної терапії вона може досягати 25–49 % [18-20]. За даними багатоцентрового дослідження, проведеного в один день у 1417 відділеннях реанімації 17 країн Європи, в якому прийняло участь понад 10 тисяч пацієнтів що перебували на лікуванні, 44,8 % пацієнтів були з інфекціями [21].

В 1-33 % випадків для таких пацієнтів виникає ризик зараження золотистим стафілококом *Staphylococcus aureus*, однак, не виключено інфікування також *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophiticus*, деякими видами *Klebsiella* та ін.

Необхідно відзначити, що санітарні заходи, які застосовуються обмежують ризик зараження даними інфекціями під час проведення операцій, однак, вони можуть розвинути у ранах після хірургічного втручання та становити загрозу життю і здоров'ю пацієнтів [22]. Інфікування можливо

через інструменти, катетери, перев'язувальні матеріали, предмети побуту.

Контамінація відкритих ділянок шкіри вищевказаними бактеріями призводить до утворення супутніх гнійно-запальних захворювань, які, як правило, мають тяжкий перебіг та погано піддаються стандартним методам лікування [23]. Основна кількість пацієнтів з гнійно-запальними захворюваннями м'яких тканин припадає на працездатний вік. Автори [24] вказують, що тільки 8 % хворих, від їх загальної кількості, має вік старіше за 65 років, а найчастіше гнійно-запальними інфекціями страждають люди 19-45 років (72 %) та 46-60 років (20 %).

Головною проблемою лікування захворювань, викликаних стафілоковими інфекціями є висока антибіотикорезистентність останніх. Природна пристосованість та неконтрольоване застосування антибіотиків призвело до виникнення метицилін-резистентного золотистого стафілококу (MRSC), клебсієли та кишкової палички. Поява мікроорганізмів, що продукують бета-лактамази розширеного спектру, ванкоміцин-резистентних ентерококів та ін. змусило дослідників приділити особливу увагу даній проблемі. β -лактамази розширеного спектру (БЛРС) – це ферменти, які виробляються грамнегативною мікрофлорою та обумовлюють її резистентність практично до будь-яких β -лактамних антибіотиків, таких як азтреонам, цефалоспорини і пеніциліни [25]. Повну чутливість (близько 100 %) до продуцентів БЛРС зберігають тільки карбапенеми. З другої половини 90-х років ХХ століття відзначається постійний ріст мікрофлори з БЛРС, особливо у відділеннях реанімації та інтенсивної терапії. За даними авторів [26] майже 60 % бактерій із сімейства *Enterobacteriaceae* є продуцентами БЛРС. За даними мікробіологічних досліджень стаціонарів, представлених в [27,28] частка виділених штамів *S. aureus*, які продукують БЛРС, становить 66,9 %.

Для вивчення чутливості до антибіотиків збудників внутрішньолікарняних інфекцій застосовують моніторинг стаціонару, який показав, що основними проблемними інфекціями є: метицилін-резистентний *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli*, яка продукує бета-лактамази розширеного

спектру (*E. coli*, EBSL (+)), *Klebsiella*, що продукує бета-лактамази розширеного спектру (*Klebsiella pneumonia*, EBSL (+)), *Pseudomonas aeruginosae* і ванкоміцин-резистентні *Enterococcus* (VRE). Зокрема, кількісний аналіз мікробіологічного профілю палат інтенсивної терапії показав такі концентрації мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* – 18 %, *Klebsiella pneumonia* – 13 %, *Enterobacteriales* – 11 %, *Escherichia coli* – 9 %, *Enterococcus* – 9 %, *Pseudomonas aeruginosae* – 7 %, *Acinetobacter* – 5 % та ін. [29].

1.2 Традиційні методики та препарати для лікування гнійних ран

Незважаючи на велику кількість наявних методик, лікування гнійних ран є досі невирішеною проблемою. У практичній хірургії застосовують два основні методи їх лікування: закритий метод – активним дрениванням [30] та метод з використанням препаратів місцевої дії [31]. При закритому методі застосовують різні мазі, що, як правило, містять антисептики і/або антибіотики. Так, автори [32] пропонують методику лікування препаратом «Левомеколь», який містить активні компоненти у вигляді хлорамфеніколу та метилурацилу.

У літературі [33] вказується, що *Citrobacter* і *Staphylococcus* чутливі до аміноглікозидів другого покоління, цефалоспоринів першого покоління і левоміцетину. Однак вказується, що дані мікроорганізми мають резистентність до популярних антибіотиків, таких як ампіцилін, еритроміцин, лінкоміцин, тетрациклін та ін.

Автори [34] вивчали етіологію запального процесу гнійних ран різної локалізації та антибіотикорезистентності збудників даного процесу. Встановлено, що в усіх пробах переважала грампозитивна мікрофлора, яка наведена в основному стафілококами, займаючи 71,8 % в перев'язочній, та 70,2 % – у палатах. Також були виявлені дріжджеподібні гриби. Виділені штами *S. aureus* виявилися полірезистентними до цефалексину, цефтазідиму, цефтріаксону. 90 % штамів проявили стійкість до пеніциліну, 97,5 % – до офлокса-

цину; до амікацину і цефотаксиму – по 95 %, до ампіциліну – 92,5 %. При цьому ізоляти зберігали чутливість до гентаміцину, ципрофлоксацину, стрептоміцину на рівні 50 % та 100 % – до ванкоміцину.

Авторами [35] проводився аналіз мікробіологічного моніторингу гнійних процесів різної етіології з подальшими рекомендаціями про способи лікування. Показано, що є 86,7 % випадків збудником була монокультура, а у 13,3 % пацієнтів виявлено асоціації з двох та більше мікроорганізмів. При цьому, в 42,1 % монокультура була представлена стафілококами, 27,8 % становили ентеробактерії і 8,4 % – НФГНБ. У 4,8 % хворих були виявлені коагулазонегативні штами, які були представлені *St. epidermidis* і *St. capitis*. Серед ентеробактерій переважали *E. Coli*, *Proteus* та ін. Також висівали *Streptococcus pyogenes* (serogroup A), *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Micrococcus lilyae*. Серед асоціацій найбільш часто зустрічалися комбінації стафілококів з ентеробактеріями (41 %). Псевдомонади зі стафілококами виявлені у 27 %. Крім того, в одиничних випадках виявлялися асоціації *St. aureus* + *St. capitis*, *St. aureus* + *Strept. spp.*, *Ps. aeruginosa* + *proteus vulgaris*. З огляду на те, що при інфекціях, викликаних ентеробактеріями, які продукують β -лактамази розширеного спектру, всі цефалоспорини II і III поколінь малоефективні [36], в якості альтернативи автори пропонують використовувати фторхінолони, а після хірургічного втручання до гнійного осередку застосовувати препарати, які діють на стафілококи, наприклад оксацилін.

Є дані про позитивний ефект застосування в процесі лікування гнійних ран антибіотика неоміцин, який проявляє антибактеріальну дію шляхом пригнічення синтезу білка [37]. Показано, що для пригнічення *Staphylococcus aureus* мінімальна концентрація препарату повинна складати 0,4–1,6 мкг/мл [38].

1.3 Недоліки традиційних препаратів для лікування ран

Хоча застосування антибіотиків спільно з системною антибактеріаль-

ною терапією здатне привести до повного одужання від ранової інфекції, не можна не звернути увагу на їх істотні недоліки через велику кількість побічних ефектів. Застосування певного виду антибіотика також може супроводжуватися зростом антибіотикорезистентності збудників.

У джерелах [39,40] автори вказують, що такі препарати як еритроміцин, тетрациклін, доксициклін та стрептоміцин мають дуже вузьку сферу застосування та не рекомендуються для рутинного лікування гнійних ран.

Таким чином, незважаючи на велике різноманіття антибіотиків, вибір їх для місцевого використання є досить обмеженим. З огляду на появу резистентності у збудників, а відповідно, зниження ефективності лікарських засобів що містять антибіотики, хірурги все більш схиляються до застосування антисептиків.

Антисептики, які можна використовувати для лікування гнійних ран, також, як і антибіотики, мають переваги та недоліки. Хоч їх позитивна дія переважає перед цитотоксичним ефектом, некоректний підхід до використання антисептиків також може чинити негативний вплив на процес загоєння ран [41,42]. Переваги антисептиків полягають в можливості застосування невеликої кількості препарату та його високою локалізацією в осередку інфекції. Це, в свою чергу, мінімізує їх системну антибактеріальну дію та системну токсичність, що робить можливим застосування антисептиків для лікування особливих категорій пацієнтів і дітей, а простота у використанні не вимагає будь-яких специфічних навичок. Перевагою антисептиків також є різноманіття їх лікарських форм. У той час як препарати антибіотиків, як правило, реалізуються у вигляді мазей та порошках, основою для антисептиків можуть бути розчини, гелі, спреї. Це дозволяє використовувати антисептики при спільному застосуванні з ударно-хвильовими та ультразвуковими системами.

Недоліки застосування антисептиків полягають в складності дозування, що може призвести до розвитку гіперчутливості та виникнення дерматиту. Також лікування антисептиками вимагає багатократного застосування, а це

може призводити до уповільнення регенерації тканин. Антисептики не можуть набувати резистентності до мікроорганізмів, але здатні піддаватися контамінації при тривалому застосуванні з одного контейнеру. Втім, використання антисептика – це процедура, спрямована на скорочення числа мікроорганізмів в рані та при його правильному застосуванні легко може бути досягнута повна ліквідація збудників [43].

В теперішній час у хірургічній практиці знайшли застосування деякі антимікробні препарати, які використовуються незалежно від ранового процесу, площі рани та даних по їх чутливість. До них відносяться «Левомеколь», діоксидин, гіпохлорит натрію, хлорофіліпт, розчин йодиду калію. У той же час є дані по їх слабку ефективність, високу цитотоксичність та ризик різноманітних побічних реакцій при використанні даних препаратів [44]. Це змушує проводити дослідження з пошуку та застосуванню нових антисептиків, лікування якими дозволяє виключити побічні ефекти, що притаманні традиційним препаратам.

1.4 Засоби для лікування інфікованих ран, що розробляються

Останнім часом надходить все більше відомостей про застосування хлоргексидину, перекису водню, повидон-йоду і препаратів срібла. Вони діють неселективно, та їх ефективність мало залежить від ступеню ексудації, некрозів і глибини рани, ніж у традиційних антисептиків [45,46].

Ще одним варіантом вирішення проблеми лікування інфікованих ран є застосування меду [47-49]. Його антимікробну дію підтверджено клінічно, і препарати, що містять мед використовуються в багатьох країнах. Мед, попередньо фільтроване і оброблений γ -опроміненням, має бактерицидну дію, яка цілком може конкурувати з ефективністю сучасних антисептиків, а відсутність цитотоксичності та позитивні результати у лікуванні інфікованих ран змушує розглядати препарати меду як гідну заміну традиційним антибактеріальним препаратам [50, 51].

Також отримані цікаві результати по застосуванню антимікробних пептидів комах в процесі лікування гнійних ран. Пептидні молекули мають руйнівну дію на клітинні стінки бактерій, при цьому, не пошкоджуючи клітини людини. Проти цих пептидів немає механізмів резистентності та штами хвороботворних мікроорганізмів зберігають до них чутливість [52]. Даний спосіб отримав назву «Maggot»-терапії. Автори [53] наводять дані щодо застосування для лікування гнійних ран стерильних личинок мух роду *Lucilia*, *Calliphora* та ін. Речовини, що виділяються даними комахами, здатні впливати на грамнегативні, грампозитивні бактерії, гриби, віруси та найпростіших. Дані пептиди витісняють іони магнію через негативно заряджену зовнішню мембрану бактерій. Після цього вони міцно зв'язуються з негативно зарядженим ліпополісахаридом, або нейтралізують негативний заряд на поверхні мембрани, що руйнує її структуру. Також пептиди опаришів здатні вбудовуватися в цитоплазматичну мембрану та порушувати цілісність клітини [54]. При цьому пептиди природного походження взаємодіють з клітинами бактерій не по одному, а групою пов'язаних, активних молекул. Ця властивість забезпечує збереження антибактеріальної активності навіть до резистентних штамів [55].

1.5 Препарати на основі срібла

Незважаючи на велику кількість існуючих антимікробних препаратів, кожен з них має свої переваги та недоліки. Це змушує дослідників шукати нові речовини, застосування яких може в якійсь мірі уніфікувати процес лікування гнійних ран або хоча б призупинити розмноження хвороботворних мікроорганізмів до закінчення підбору ефективного лікарського препарату.

Таким речовиною може бути срібло та його похідні. Срібло застосовувалося в якості антимікробного агенту протягом століть [56,57]. Фінікійці використовували срібні посудини для збереження води та вина під час тривалих подорожей. Офіційно антисептичні властивості срібла знайшли своє підтвердження в 1884 році, коли німецький акушер Carl Siegmund Franz

Credé застосував 1 %-й розчин нітрату срібла (AgNO_3) в якості офтальмологічного засобу при профілактиці гонококової інфекції новонароджених. [58]. В даний час препарати срібла широко застосовуються в різних галузях медицини. Протаргол (протеїнат срібла) і коларгол використовують при запаленні очей, різних інфекціях, застуді, епілепсії, гонорей та ін. В опікових відділеннях досі місцево застосовують крем сульфадіазину срібла, який є стандартним антибактеріальним засобом для лікування серйозних ран [59].

Існують різні теорії, що пояснюють механізм дії срібла на бактерійну клітку, але найбільш популярною в даний час є адсорбційна теорія. Згідно цієї теорії, іони срібла адсорбуються мембраною бактерії і взаємодіють з клітинною мембраною, яка складається з бактерійних білків, – пептидогліканів. Вони забезпечують механічну міцність і структурно-функціональні властивості мембран бактерій та простіших. У цьому процесі іони Ag^+ взаємодіють з карбоксильними і аміногрупами пептидогліканів, формуючи металопротеїнові комплекси, що призводить до зміни структури і стійкості пептидогліканів. Це, у свою чергу, позбавляє їх можливості транспортувати кисень всередину бактерійної клітки, призводить до кисневого голодування і подальшої загибелі мікроорганізму.

Аналогічно срібло діє і на дихальні ферменти мікроорганізмів, вбудовуючись в реакційний центр ферментів. На клітини ссавців срібло не діє, оскільки їх клітинні мембрани не містять пептидоглікани. Дослідження за допомогою електронної мікроскопії показали, що дія іонів срібла на клітини бактерій призводить до їх морфологічних змін, внаслідок чого форма клітин спотворюється, а на поверхні з'являються пухирці [60].

Також відомо, що срібло здатне інактивувати деякі ферменти за допомогою зв'язування з SH-групами, внаслідок чого утворюються сульфід срібла. Утворення комплексів з SH-групами може блокувати ферменти на поверхні клітини і змінювати процеси дихання в клітинній мембрані.

Срібло зв'язує протеїни бактерій у вигляді органічних сульфідів, приводить до структурних змін в бактеріях і взаємодіє з нуклеїновими

кислотами [61]. Іони срібла зв'язуються з ДНК і блокують транскрипцію, а ті іони, які зв'язалися з поверхнею клітини, переривають дихання бактерії і синтез АТФ. Також є відомості, що активність срібла також пов'язана з розкручуванням спіралі ДНК клітин [62]. У деяких бактерій спостерігається незворотня взаємодія іонів срібла з цистеїновим залишком в ізомеразі фосфоманози, що перериває синтез стінок клітки і призводить до її загибелі [63]. Іони срібла знижують засвоєння фосфатів, пригніблюють функції ДНК, інгібують трансмембранний транспорт біогенних речовин [64]. Також срібло може взаємодіяти з аміно-, карбокси-, фосфатно- та імідазольними групами ферментів, інгібуючи активність глюкозооксидази, β -галактозидази, лактат-дегідрогенази та глутатион-пероксидази [65].

Антимікробна активність срібла зробила препарати на його основі найбільш популярними комерційними продуктами. Наносрібло, нанесене на інертний носій здатне пригнічувати ріст таких мультирезистентних бактерій як *S. aureus*, *E. Coli*, *Vibrio cholerae*, і *Pseudomonas aeruginosa* [66-68]. Вважається, що антибактеріальна активність обумовлена виділенням катіонів срібла від наноструктурованої поверхні [69], які здатні змінювати клітинну проникність і виробляти активні форми кисню [70,71].

Колоїдне срібло складається із розподілених у розчиннику наночастиць та може містити стабілізатор колоїдної системи. На основі колоїдного срібла випускаються такі препарати як коларгол, повіаргол, арговіт, аргогель, аргоніка, сіал-С, протаргол та ін. які мають антибактеріальну, протівірусну і протигрибкову дію. У зв'язку з цим, не виключені різні біологічні ефекти надходження даного наноматеріалу в організм.

Найбільш поширеним антибактеріальний препаратом на основі срібла, який традиційно асоціюється з лікуванням інфікованих ран, є нітрат срібла [72]. Він надає антисептичну, протизапальну, припікаючу, в'яжучу, бактерицидну дію, зв'язує карбоксильні та сульфгідрильні групи. Це викликає зміну конформації білка, або його денатурацію. За роки застосування даного препарату, його неодноразово вдосконалювали, в основному

шляхом додавання до складу AgNO_3 різних компонентів, таких як ментол – для знеболюючого та охолоджуючого ефектів, пропіленгліколь – з метою поліпшення відтоку ексудату або гліцерол для прискорення процесу загоєння ран [73]. Додавання 4,5-діазафлюоренона дозволило знизити концентрацію азотистого срібла, зберігши при цьому антибактеріальну активність на попередніх рівнях. Автори стверджують, що препарат виявляв протимікробну дію як проти збудників ранових інфекцій *S. aureus*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*, так і проти *C. albicans* [74-76].

Незважаючи на те, що срібло відноситься до розряду найсильніших природних антисептиків та здатне викликати загибель більш ніж 650 видів бактерій, стрімкий розвиток нанотехнологій викликає гарячі суперечки з приводу можливої токсичності або несприятливого впливу наночастинок на живі організми [77]. Є дані, що свідчать про те, що при перетворенні матеріалів в форму наночастинок вони радикально змінюють свої фізико-хімічні властивості, що може вплинути на їх фізіологічних ефектах [78]. У порівнянні з макрочастинками металевого срібла його наночастинок можуть проявляти набагато більшу токсичність, яка може бути пов'язана з окислювальним стресом, порушенням функцій мітохондрій та збільшенням проникності мембрани [79].

Дослідження гострої токсичності наночастинок гелю срібла на щурах Sprague Dawley показало, що середньосмертельна доза LD_{50} при пероральному шляху надходження становить 1266 мг/кг, а при нанесенні на шкіру – більше 2000 мг/кг. LD_{50} колоїдного розчину срібла в досліджах на мишах становила 2820 мг/кг [80-85].

Таким чином, незважаючи на наявність значного клінічного досвіду застосування препаратів срібла в медичній практиці, результати наукових досліджень викликають занепокоєння та регулярно піддаються критичній оцінці стосовно його ефективності та безпеки. Це пов'язано з тим, що, в разі використання препаратів, які містять срібло, напрямок ефекту часто залежить від індивідуального досвіду лікаря, особливостей організму, коли, як довго та

в яких клінічних випадках ці препарати повинні застосовуватися [86]. Пристрасті також підігрують публікації з приводу можливої токсичності або несприятливого впливу наночастинок срібла на живі організми [87]. Є дані, що свідчать про те, що при перетворенні металевих матеріалів в форму наночастинок вони радикально змінюють свої фізико-хімічні властивості, що може позначитись на їх фізіологічних ефектах [88].

1.6 Антимікробна дія бактеріоцинів

Одним з перспективних методів боротьби з патогенними бактеріями є використання бактеріоцинів. Бактеріоцини мають ряд переваг, що дозволяють використовувати їх в якості альтернативи антибіотиків, а саме [89]:

- мають антимікробну активність (як визначено *in vitro* та *in vivo*);
- мають низьку токсичність;
- мають широкий і вузький спектр дії різних пептидів;
- дають можливість виробництва *in situ* пробіотиками та можливість створення на їх основі біоінженерних конструкцій.

Є публікації щодо можливості використання бактеріоцинів при лікуванні онкологічних захворювань [90].

Можна сказати про те, що, в разі успішного вивчення особливостей функціонування бактеріоцинів, в недалекому майбутньому з'являться нові способи боротьби з інфекційними бактеріальними захворюваннями, що стане гідною альтернативою антибіотикам.

Бактеріоцини – велике сімейство, що секретується бактеріями пептидів, які мають антимікробну активність та діють проти інших штамів того ж виду або близькоспоріднених видів [91]. Бактеріоцини синтезуються майже всіма відомими бактеріями, як грампозитивними, так і грамнегативними. Обидва типи цих бактерій пригнічують близькоспоріднені види і тим самим припиняють їх ріст.

Бактеріоцини представляють собою комплекс пептидів з молекулярною масою від 2 до 35 кДа, що істотно відрізняються один від одного за фізико-

хімічними характеристиками і біологічних ефектів [92]. Виявлено, що на прояв антагоністичної активності бактеріоцинів, впливають температура, електричне поле, рН, склад, консистенція середовища, присутність іонів Ca^{2+} і Mg^{2+} та інші фактори [93].

До числа загальних властивостей бактеріоцинів відноситься їх чутливість до температури, хоча це властивість також може варіювати в широких межах. Деякі руйнуються при температурі 48–50 С, інші короткочасно витримують температуру 60-70 С, а окремі зберігають активність навіть при 100 °С. Бактеріоцини чутливі до дії протеаз і мають різну молекулярну вагу (30 000-100 000 Да). Білок бактеріоцину пов'язаний з ліпополісахаридом клітинної оболонки, але тільки білкова частина молекули має антибактеріальну активність [94]. За фізико-хімічними властивостями, амінокислотним складом, способами виведення та антимікробним спектром дії бактеріоцини класифікують на 4 класи [95-97]. Клас I представляють малі лінійні термостабільні пептиди, ($M < 5$ кДа), які містять модифіковані амінокислотні залишки, так звані лантибіотики; клас II – малі термостабільні пептиди ($M < 10$ кДа), які не містять модифіковані амінокислотні залишки; клас III – термолабільні антимікробні протеїни ($M > 25$ кДа) і клас IV – малі термостабільні циклічні пептиди ($M < 8$ кДа) [98,99]. Найбільш відомим представником бактеріоцинів, які широко застосовуються в якості антимікробних препаратів є нізин (рис. 1.1).

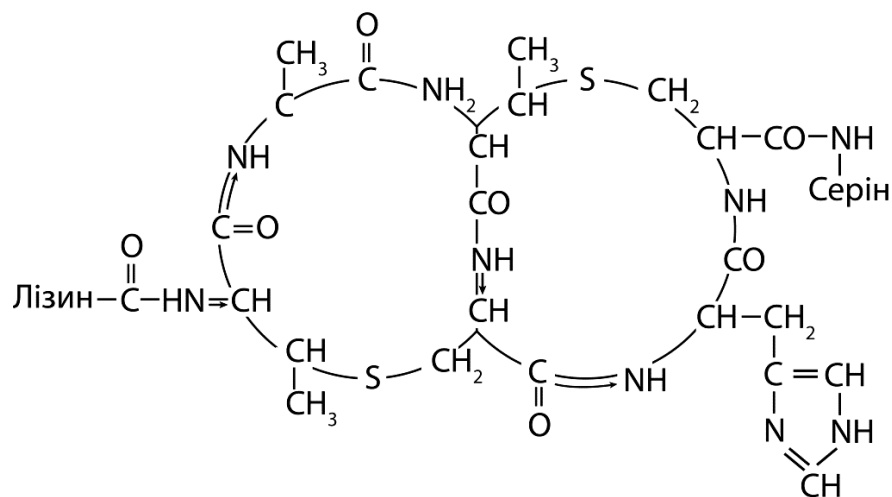


Рис. 1.1. Структура нізину [100].

Відомо, що нізин є натуральним, нетоксичним пептидом, що має антибактеріальну дію. Він отримується за допомогою спеціального штаму харчової молочнокислої бактерії *Lactococcus lactis subsp. lactis* в процесі ферментації. Ця речовина була відкрита понад 50 років тому, задовго до появи більшості інших бактеріоцинів [101]. Нізин визнаний безпечним при використанні більш ніж в 50 країнах. Він має антибактеріальну дію проти широкого спектра грампозитивних бактерій, включаючи спороутворюючі бактерії, такі, як *Bacillus cereus*, а також проти *Listeria Monocytogenes*. Механізм його антимікробної дії добре вивчений.

Основний характер дії нізина – це взаємодія з негативно зарядженими мембранами (біліпідний шар), переважно з мембранами, що містять аніонні ліпіди (рис.1.2).

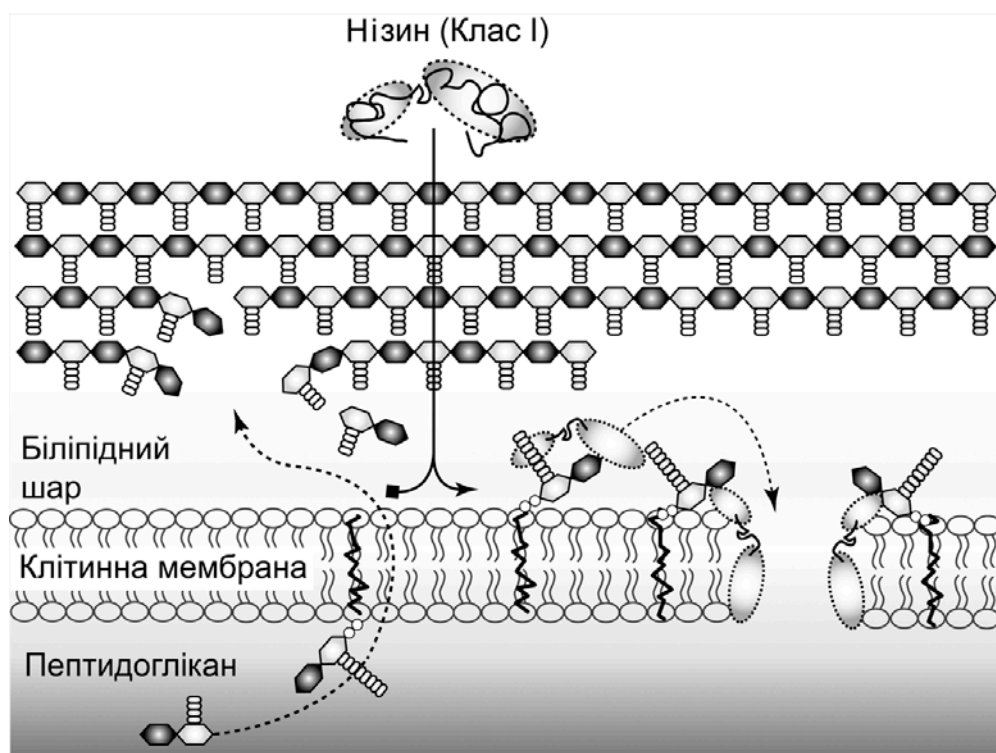


Рис. 1.2. Механізм антимікробної дії нізину [102].

Грампозитивні бактерії мають більш високі концентрації аніонного ліпиду в їх цитоплазматичній мембрані в порівнянні з грамнегативними.

Бактеріоцини спочатку пов'язують його С-кінець з аніонними ліпідами, після чого N-кінець занурюється в ліпід мембрани і пептид приймає паралельне положення на мембранній поверхні. Після цього цілий пептид має можливість переміститися по всій довжині пори [103]. Нізин пригнічує синтез муреїну клітинної стінки. В результаті дії антибіотика відбувається накопичення проміжного ліпиду, з яким нізин утворює міцний комплекс, що й призводить до зупинки подальшого синтезу пептидоглікану бактеріальної стінки. Нізин може викликати лізис клітин внаслідок незворотньої деструкції клітинної мембрани, який регулюється осмотичним тиском клітини. Він змінює поверхневий натяг мембрани цитоплазми, що призводить до порушення клітинної проникності і, як наслідок цього, до бактеріального лізису. Таким чином, антибактеріальною дією нізина є, бактеріостатична; він не знищує спори бактерій, але перешкоджає набухання спор після проростання та пригнічує їх ріст.

У плані стабільності дана речовина досить невибаглива: нізин зберігає свої властивості в широкому інтервалі рН (від 3,5 до 8,0) і витримує кип'ятіння без втрати активності. Завдяки високій стійкості нізин надійно зберігає свою ефективність при різних методах обробки.

Автори [104] вивчали антимікробну активність деяких бактеріоцинів, зокрема нізину. Було встановлено, що нізин препарату Nisaplin пригнічував ріст грампозитивних бактерій, включаючи бацили *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. mycoides*, мікрококи *Micrococcus luteus*, *Micrococcus flavum*, патогенний золотистий стафілокок *Staphylococcus aureus*.

Результати [105] показали, що нізин F (випускається під торговими марками Nisaplin в США і Nisin Vega в Китаї) інгібував ріст *S. aureus* у інфікованих мишей протягом 15 хв. після введення, а клінічні випробування нізина А при лікуванні маститу у восьми жінок показали значне зниження кількості *S. aureus* в грудному молоці і повне одужання через 14 днів [106]. При цьому, автори [107] показали, що нізин А проявляє антимікробну активність в першу чергу проти грампозитивних бактерій, тоді, як проти

грамнегативних бактерій він діє тільки тоді, коли зовнішня мембрана пошкоджена іншими препаратами.

Автори [108] визначали антимікробну активність нізина F по відношенню до *S. aureus* в дихальних шляхах. Показано, що нізин F пригнічував ріст золотистого стафілококу у щурів з ослабленим імунітетом, при цьому, лікування нізином F в кількості 8192 AU безпечно, тому, що трахея, легені, бронхи і гематологія щурів залишилися без змін. Автори роблять висновок, що нізин F є нетоксичним і може використовуватися для боротьби з інфекціями дихальних шляхів, викликаними *S. aureus*. При цьому вказується, що хоча моделі на тварин і служать важливою ланкою між моделями *in vitro* та клінічними дослідженнями на людях, представлені дані являються є попередніми і повинні бути підтверджені дослідженнями на добровольцях, перш ніж нізин F буде оголошений безпечним для застосування.

Є велика кількість публікацій, які вказують на той факт, що сам по собі нізин проявляє слабку антимікробну дію, однак його композиції з іншими компонентами дозволяють отримувати достатньо ефективні препарати.

Так, автори [109] вивчали антимікробний потенціал нізина відносно деяких мікроорганізмів, які можуть викликати контамінацію косметичних продуктів, а саме: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Aspergillus brasiliensis*. Показано, що нізин ефективний у пригніченні грампозитивних мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* і *Bacillus sp.* Для інших протестованих мікроорганізмів нізин виявився неефективним, і тільки комбінація нізина, ЕДТА і синтетичних консервантів показали антимікробну активність відповідно до критерію А з ISO 11930. У цьому дослідженні зроблено висновок, що нізин може бути альтернативою, коли він пов'язаний з іншими кокомпонентами.

В роботі [110] також вказується, що тільки сумісне використання лактококів і антибіотикотерапії здатне підвищити ефективність впливу на патогенні мікроорганізми і прискорити процес одужання пацієнтів.

До такого ж висновку приходять в роботі [111], де вивчали

антибактеріальну активність бактеріоцинів класів I (нізин А) та IIa (педіоцин PA-1; продуцент *Pediococcus acidilactici* UL5) в комбінації з антибіотиком полімиксином Е по відношенню до стійких штамів *Listeria monocytogenes* і *Escherichia coli*. Полімиксин та полімиксин/нізин знижували ріст *E. coli*, а комбінація полімиксин/педіоцин ефективно пригнічувала ріст *L. Monocytogenes* [112]. Автори приходять до висновку, що антимікробні пептиди бактеріоцини можуть бути використані для посилення дії традиційних антибіотиків, особливо, коли необхідно купірувати інфекційний процес, викликаний мульти- або панрезистентним збудниками, або коли підвищення дози антибіотика може викликати небезпечний або небажаний побічний ефект.

Незважаючи на наявність антибактеріальних властивостей, нізин в даний час активно використовується в харчовій промисловості, але його медичне застосування не виходить за рамки експериментальних досліджень.

На основі вищенаведеного, гіпотезою роботи було дослідження можливості застосування бактеріоцину нізину в якості складової антимікробного гелю для лікування гнійних уражень шкірного покриву після травм, опіків, хірургічного втручання.

1.7 Основи мазей для лікування інфікованих ран

На ефективність використання антибактеріальних засобів впливає не тільки діюча речовина. Важливим фактором також є основа, в якій воно розподілено. Останнім часом приділяється увага не тільки фармако-терапевтичним характеристикам мазей, але і таким показникам, як природа носія, його рН, тип дисперсної системи, структурно-механічним та осмотичним властивостям, та ін. [113,114]. Для лікування гнійних ран, інфікованих опіків, пролежнів, дерматитів та інших захворювань, що характеризуються наявністю ексудативних виділень, особливого значення набувають осмотичні властивості препарату, що застосовується. Залежно від стану поверхні рани використовують мазі з різною осмотичною активністю, тому що їх осмотич-

на дія є тим фактором, який забезпечує активний відтік ексудату, прибирає набряк тканини, обмежує всмоктування продуктів розпаду в організм, і, тим самим, створює достатні умови для загоєння поверхні рани [115,116]. При цьому залишається відкритим питання з вибором матеріалу, який може використовуватися в якості носія для лікарських препаратів на всіх стадіях запального процесу [117]. Особливо перспективним залишається варіант створення покриттів на основі полімерних композицій природного походження [118-122].

В огляді [123] вказується, що в клінічній практиці найчастіше використовують мазі на вазелін-ланолінової основі, які містять антибіотики. Однак ці мазі виявляють короткочасну дію, так як вазелін-ланолінова основа порушує відтік ексудату, не забезпечуючи при цьому достатнього вивільнення активного компоненту. Таким чином антибіотик не проникає вглиб тканин, де знаходиться осередок інфекції, що може привести до переходу гострих запальних процесів в хронічні, а також змушує проводити перев'язки кілька разів на добу.

В останні роки у хірургічній практиці знайшли застосування мазі на поліетиленоксидній основі з молекулярною вагою 400 (ПЕО-400) та 1500 (ПЕО-1500). Дані речовини є похідними окису етилену, мають низьку токсичність і достатню осмотичну активність. Механізм дії ПЕО-1500 полягає в зв'язуванні гнійного ексудату з рани, віддаючи його в пов'язку, з поверхні якої рідина випаровується, а звільнені молекули ПЕО-1500 знову приєднують до себе ексудат, який накопичується на дні рани. ПЕО-400 складається з більш дрібних молекул, які здатні проникати вглиб тканин. Таким чином, ПЕО-400 утворює комплекс з антибіотиком та переносить його в тканини, де локалізується інфекція [124]. Цим він принципово відрізняється від мазей на вазелін-ланолінової основі, які здатні надавати антимікробну дію тільки короткочасно і тільки на поверхні рани.

В роботі [125] наведені дані досліджень ефективності фурацилінових антимікробних мазей, отриманих на різних носіях. В якості основ

використовували вазелін, поліетиленгліколь 400, поліетиленгліколь 1500. В якості гелеутворювача використовували метилцелюлозу і карбомер 640 [126]. Результати показали, що найбільший ступінь вивільнення фурациліну має мазь, яка приготована на основі сплаву поліетиленгліколей. Вивільнення активної речовини спостерігається в перші години з моменту нанесення і триває протягом доби. Мазь на основі метилцелюлози незначно поступається першому зразку. Тут спостерігається поступове наростання ступеню вивільнення, так, що даний зразок можна оцінювати як мазь з пролонгованою дією.

Авторами [127] наведено розробку методики приготування та аналізу клінічної активності гелів для загоювання ран з діючою речовиною у вигляді комплексу срібла Ag (I) на основі гідрогелю метилцелюлози. Стабільність мазі забезпечується за рахунок використання добавок пропіленгліколю, лимонної кислоти і полівінілпіролідону [128]. В роботі показано, що отримані гелі проявляють високу антимікробну активність відносно грамнегативних (*E. coli*, *P. aeruginosa*), грампозитивних бактерій (*S. aureus*), дріжджових (*Candida spp.*) та цвілевих грибів (*Aspergillus niger*). Автори пропонують використовувати дані гелі для лікування інфікованих ран.

Для пролонгування лікарських препаратів у вигляді мазей використовують розчини високомолекулярних сполук з різноманітною концентрацією, що дозволяє регулювати тривалість доставки препарату в осередок інфекції. До таких речовин відносяться метилцелюлоза (МЦ), карбоксиметилцелюлоза (КМЦ) або натрій-КМЦ, полівінілпіролідон, колаген та ін. [129, 130]. Останнім для створення основ мазей використовують колоїдні розчини карбоксиметилцелюлози (КМЦ) та її натрієвої солі. Вони мають переваги перед аналогами через низьку токсичність та хорошу розчинність в полярних розчинниках. Вони стійкі до світла, температури, та майже не піддаються біологічній контамінації [131,132]. Мазі, на основі КМЦ мають високу осмотичну активність, що сприяє очищенню ран і відторгненню некротичних мас [133].

В роботі [134] було вивчено ранозагоювальну дію бензалконію хлориду і метронідазолу на основі натрієвої солі карбоксиметилцелюлози (Na-КМЦ) та поліетиленоксиду (ПЕО) в лікуванні експериментальної гнійної рани. Препаратом порівняння був обраний «Левомеколь». За результатами дослідження автори дають рекомендації, що комбінацію на основі Na-КМЦ слід застосовувати в перші 3 доби першої фази перебігу ранового процесу, після чого переходити на використання комбінації з основою у вигляді ПЕО, коли відзначається найбільша швидкість загоєння.

Автори [135] наводять дослідження розробки мазей для лікування місцевих гнійно-запальних процесів. В якості діючої речовини був обраний антибіотик макролідного ряду еритроміцину естолат. Мазь готували на гідрофільних основах, що містять сплав поліетиленоксидів 400 і 1500 в співвідношенні 8:2 та 5 % гліцерогелі Na-КМЦ. Результати в досліджах *in vivo* на моделі полношарової гнійної рани показали високу ефективність розроблених багатокомпонентних мазей. У порівнянні з контролем – промисловою маззю еритроміцину (1%) і маззю еритроміцину естолат на ланолін-вазелиновій основі – терміни загоєння скорочувалися в 2 рази. При цьому, мазь, яка приготована на основі полімеру целюлози 5 % гліцерогелю Na-КМЦ, забезпечує найбільшу затримку росту хвороботворних бактерій. Автори стверджують, що ця мазь за своєю ефективності значно перевершує мазі, приготовані на всіх інших основах.

Останнім часом з'явилася велика кількість публікацій щодо використання в якості основ мазей так званих карбомерів. З хімічної точки зору вони являють собою високомолекулярні полімери акрилової кислоти, крос-зшиті з поліалкениловим спиртом або дівінілгліколем [136].

Дані речовини мають ряд переваг, таких як біологічна адгезія, швидке вивільнення, поліпшення текучості та ін. Також карбополімери успішно застосовуються в твердому вигляді для прямого пресування та вологої або сухої грануляції, препаратах для зовнішнього застосування, пероральних суспензіях і розчинах, препаратах по догляду за порожниною рота [137].

Карбомери можна розділити на кілька груп: Carbopol, Pemulen і Noveon Polycarbophil AA-1. Найбільш цікавим з практичної точки зору є карбопол. Він являє собою білий, легкий, гігроскопічний, аморфний порошок без запаху. Розчиняється в гідрофільних розчинниках, повільно набухає у водному або водно-полімерному середовищі. Має згущуючу здатність, завдяки чому в фармації знайшов широке застосування в якості гелеутворювача. Гелі на основі карбополу утворюють на шкірі тонкі плівки, забезпечують пролонговану дію препарату і рівномірне вивільнення активної речовини [138].

Карбополи залишаються стабільними при зберіганні в нормальних умовах і не втрачають своїх властивостей навіть протягом 5 років. Завдяки крос-зшитій природі порошок не розчиняється у воді, але набухає в ній і в деяких полярних розчинниках, утворюючи в'язкі дисперсії. Таким чином, карбопол може виступати в ролі гелеутворювача. Для приготування гелю його необхідно зовсім небагато, близько 0,1 – 3%. Такої кількості карбополу цілком достатньо, щоб утворити гель з необхідною в'язкістю. Наприклад, в водно-спиртових гелях для зовнішнього застосування концентрація карбополу становить 0,5 – 3%, а для пероральних суспензій досить використовувати 0,1 – 1% речовини. Після набухання частки карбополу збільшуються в 10 разів. На кінцеву в'язкість гелю впливають три параметра: концентрація карбополу, рН і ступінь утворення водневих зв'язків [139–141].

Для утворення полімеру необхідно нейтралізація карбополу основою. В якості основи можуть виступати органічні, неорганічні речовини, амінокислоти та ін. Максимальна в'язкість досягається при нейтральному середовищі при рН 6,0 – 7,0.

Для систем, де регулювати рН неможливо, ступінь загущення може бути збільшена за допомогою водневого зв'язування з гідроксильними донорами інших компонентів [142]. В якості донорів можуть виступати поліоли: гліцерин, ПЕГ, ППГ, цукрові спирти – манітол, сорбітол або неіоногенні ПАР, ПЕО.

Відмінною особливістю гелів, отриманих з використанням карбополу, є те, що вони практично позбавлені тиксотропії або вона присутня в незначній мірі [143]. Це дозволяє отримувати препарати з тривалим терміном зберігання. При цьому дані продукти прості у виготовленні і не вимагають застосування унікального та дорогого обладнання. До недоліків карбополу можна віднести довгий час попереднього замочування (до 12 годин), проте сучасні марки вже позбавлені цього недоліку [144].

Автори [145] наводять технологію приготування гемостатичного гелю на основі зайцегуба п'яного та карбополу-934. Даний препарат пропонують використовувати в стоматології, а також при лікуванні гнійних захворювань та інших ран.

Автори [146] вивчали зміну реологічних властивостей адсорбційного гідрофільного гелю «Метрогіл» для лікування бактеріального вагінозу (БВ) на основі карбомеру, який має антианаеробну дію. Показано, що технологічний реологічний оптимум екструзії гелю досягається при наступному співвідношенні – карбопол 0.3% + ентеросгель 15% і карбопол 0.3% + ентеросгель 20%. Препарат не змінює свої реологічні параметри при зберіганні протягом 70 діб при відносній вологості повітря 70% і температурі 20 ± 5 °C.

В роботі [147] описана технологія приготування зразків гелів ніфедипіну в різних співвідношеннях компонентів основи. В якості останньої був обраний карбопол 2020 (Carbopol® 2020 NF Polymer, Індія). Набряклий структуроутворювач нейтралізували водним розчином ТЕА («BASF», Німеччина) для утворення структури гелю. Вказується, що нейтралізація систем амінами, такими як ТЕА, дає можливість отримувати гель з майже незмінними реологічними параметрами в широкому діапазоні значень рН.

Автори [148] наводять результати досліджень впливу ПЕГ-40 гідрогенізованої касторової олії, яка може використовуватися в якості емульгатора, солюбілізатора, модифікатора в'язкості та розчинника при виготовленні гелей, на структурно-механічні властивості гелів карбополу.

Показано, що додавання гідрогенізованих рослинних масел та їх сполук надає істотного впливу на реологічний стан гелів на основі карбополу, що необхідно враховувати при фармацевтичній розробки нових лікарських засобів.

В роботі [149] представлена технологія приготування ранозагоювального гелю з L-лізін-альфа-оксидазою та основою у вигляді карбополу (974P). Автори вивчали стабільність розробленого гелю з використанням фізико-хімічних, реологічних і мікробіологічних методів аналізу за такими показниками: зовнішній вигляд гелю, запах, значення рН, однорідність, колоїдна стабільність. Результати досліджень даного гелю в дослідях на тваринах показали його високу ранозагоювальну активність з концентрацією активної речовини 1%.

У публікації [150] наводиться технологія приготування дерматопротектора на основі комірника в'язолистного. В якості модельних основ використовували суміш поліетиленоксидів 1500 та 400, карбопол-940, метилцелюлозу і вазелін. Автори вказують, що оптимальним варіантом в якості основи для виробництва мазей є використання карбополу (гелю), тому що в мазі на основі карбополу спостерігається більш швидке вивільнення діючої речовини, ніж на основі метилцелюлози або суміші ПЕО.

Автори [151] наводять технологію приготування противарикозного гелю з комбінації екстракту листя винограду та гепарину. В якості гелеутворювача використовували карбопол-980. Показано, що оптимальними показниками гелю є концентрація 1,7 % при рН 6,8. Вищий вміст карбополу призводив до утворення високов'язких гелів, що утрудняло екструзію з туб та фіксацію на шкірі. При меншій концентрації утворювались високотекучі системи.

В роботі [152] автори вказують, що тривале застосування гелів карбополу в дерматології не надає шкірі сенсibiliзуючої та дратівної дії навіть у осіб, схильних до алергічних реакцій. Карбопол забезпечує пролонгований ефект, більш повно і рівномірно вивільняє лікарські

речовини, поглинає шкірні екскреторні продукти, добре розподіляється на слизових оболонках та шкірної поверхні. Також, в роботі [153] автори стверджують, що токсичність систем спрямованої пероральної доставки лікарських засобів на основі карбополу не перевищує токсичність самого сополімеру, тому поєднання сополімерів з кабополом можуть бути використані в якості інноваційних форм для спрямованої доставки лікарських речовин.

Таким чином, на основі літературного пошуку можна зробити висновок, що препарати у вигляді гелевих композицій на основі КМЦ або її натрієвої солі, а також гелеві композиції на основі різноманітних типів карбополу мають здатність пролонговано вивільняти активну речовину в область осередку інфекції. Це дозволяє створювати антибактеріальні засоби для лікування інфікованих ран, що мають більшу ефективність, ніж традиційні препарати на ланолін-вазеліновій основі.

Висновки до розділу 1:

1. Розвиток запальних захворювань відкритих ран наразі є актуальною проблемою операційних, палат інтенсивної терапії, реанімацій та опікових відділень.

2. Лікування гнійних ран за допомогою антибіотиків не завжди приводить до позитивного ефекту через резистентність мікроорганізмів до препаратів, які традиційно застосовувались у хірургічній практиці впродовж багатьох років.

3. Використання традиційних антисептиків не може повною мірою замінити антибіотикотерапію через їх повільну дію та побічні ефекти.

4. Застосування препаратів срібла певною мірою не можуть вирішити проблему загоєння запальних ран, часто через відсутність бажаного ефекту та наявності низки побічних ефектів.

5. Для підвищення ефективності лікування слід розробити новий препарат на основі бактеріоцину нізину, який би мав антисептичну дію проти наявних хвороботворних мікроорганізмів, в тому числі і тих, що мають

резистентність до антибіотиків.

6. В процесі лікування гнійних ран за допомогою мазей має значення не тільки активна речовина, а й основа, в якій вона розподілена. В даному випадку найбільш прийнятними основами є карбоксиметилцелюлоза (КМЦ) та карбопол, які цілком відповідають вимогам до основ мазей та мають оптимальну тривалість вивільнення діючої речовини.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Мікробіологічні методи *in vitro*

2.1.1. *Метод вивчення затримки росту.* Антимікробна дія препаратів вивчалася по відношенню до *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* та *Escherichia coli*. Використовувалися чисті добові культури мікроорганізмів. Дослідження по вивченню антимікробної дії *in vitro* проводили методом колодязів. Принцип метода полягає в тому, що незначна кількість мікроорганізмів обережно переноситься петлею з поверхні колоній в пробірку із стерильним м'ясопептонним бульйоном (МПБ). Суспензію досліджуваного матеріалу готували за стандартом каламутності так, щоб її концентрація відповідала показникам кожного конкретного мікроорганізму в КУО/мл. Для реєстрації оптичної щільності мікробних суспензій використовували автоматичний мутномір Densi-La-Meter.

Ріст мікроорганізмів здійснювався в чашках Петрі на агарі Мюллера-Хинтона. Для цього 38 г порошку M173 компанії HIMEDIA (Індія) розчиняли в 1000 мл дистильованої води, до повного розчинення, після чого стерилізували в автоклаві при 1,1 Атм і 120 °С впродовж 15 хв. Після стерилізації в стерильну чашку Петрі встановлювали циліндри з неіржавіючої сталі діаметром 6 мм і заввишки 10 мм, потім навколо цих циліндрів розливали приготоване та охолоджене до 40 °С живильне середовище. Для отримання повного газону культури мікроорганізмів вносили 1 мл суспензії мікробної культури на 100 мл живильного середовища. Така методика дозволяє отримати оптимальну кінцеву концентрацію мікроорганізмів 10^7 КУО/мл.

Після охолодження агару, циліндри видаляли стерильним пінцетом, а в лунки, що утворилися, поміщали по 0,3 мл розчину антимікробного препарату.

Після 24 години інкубації в термостаті при 35 °С проводили аналіз результатів по зоні пригнічення росту, заміряною з точністю до 1 мм,

включаючи діаметр лунок. При цьому не враховували дуже малі колонії тест-штамів та наліт на краю зони затримки росту.

Протимікробна дія досліджуваних препаратів реєструвалась шляхом вимірювання затримки росту популяції навколо колодязя в мм.

2.1.2. Визначення оптимальної концентрації нізину. Антимікробна активність вивчалася на експериментальній суміші наступного складу: 10% NH_4OH – 5 мл; карбопол – 0,2 г; нізин – 0,05 – 0,3 г; $\text{H}_2\text{O}_{(\text{дист.})}$ – до 10 мл. Використовувалися чисті добові культури мікроорганізмів, які вирости на щільному живильному середовищі. Дослідження з вивчення антимікробної дії *in vitro* проводили методом дифузії в агар. Для підготовки мікробних суспензій використовували автоматичний мутномір Densi-La-Meter. Ріст мікроорганізмів здійснювався в чашках Петрі на агарі Мюллера-Хинтона.

2.1.3. Приготування гелю карбоксиметилцелюлози. Основний гель КМЦ готували за такою методикою: в залежності від запланованої концентрації розчину до необхідного обсягу дистильованої або деіонізованої води додавали потрібну кількість сухого порошку КМЦ. Суміш підігрівали до 70°C одночасно перемішуючи механічною мішалкою до утворення однорідної желеподібної структури без наявності грудок та згустків. Визначення умовної в'язкості здійснювали за допомогою віскозиметра ВБР-1 шляхом вимірювання секундоміром тривалості витікання розчину з отвору діаметром 5 мм. Така методика дозволяє отримати дані умовної в'язкості шляхом визначення тривалості витікання гелю відносно до тривалості витікання такої ж кількості дистильованої води.

2.1.4. Дослідження в'язкості розчину КМЦ відносно допоміжних чинників. Для розробки гелю оптимальної в'язкості проводили дослідження впливу допоміжних чинників на дану характеристику. Водневий показник рН визначали на рН-метрі марки Eutech-510. рН отриманих розчинів залежав від впливу природи модифікатора. В якості модифікатора використовувались такі речовини: 1 – гліцерин; 2 – аскорбінова кислота; 3 – розчин аскорбінової кислоти в гліцерині.

Дослідження залежності розчинення КМЦ від температури проводили на 5% розчині карбоксиметилцелюлози без модифікаторів за допомогою віскозиметра, одночасно реєструючи температуру термометром. Діапазон температур складав 26 – 43°C.

Не менш важливою складовою для створення композицій на основі КМЦ є її концентрація, від якої залежать не тільки фізико-хімічні властивості гелю, але й здатність розчину зберігати свою стабільність протягом потрібного терміна. Дослідження впливу концентрації КМЦ на в'язкість гелю. Для цього використовували емпіричні залежності в'язкості гелів, які побудовані із застосуванням малої кількості КМЦ. Після отримання експериментальних даних та створення на їх основі регресивної моделі, останню можна сфокусувати на визначення в'язкості більш концентрованих розчинів.

2.1.5. Приготування гелю на основі карбополу. Гель на основі карбополу готували за наступною методикою: в залежності від запланованої концентрації розчину до необхідного обсягу дистильованої або деіонізованої води додавали потрібну кількість сухого порошку карбополу. Суміш перемішували механічною мішалкою до утворення однорідної гелелеподібної речовини без наявності грудок та згустків. Після цього до отриманої суміші додавали 10% NH_4OH для нейтралізації водної суспензії.

2.1.6 Дослідження показників в'язкості розчину карбополу. Дослідження впливу показників в'язкості розчину карбополу проводили за вищеописаними методиками для розчину КМЦ.

2.2 Об'єкт та матеріали досліджень

У дисертаційному дослідженні для моделювання експериментальних ран були використані лабораторні тварини – дорослі білі миші (самці, масою 20-22 г). Досліди на тваринах проводилися в Експериментально-біологічній клініці (віварій) Харківського національного медичного університету

(ХНМУ) відповідно до Женевської конвенції 1985 року про «Міжнародні принципи біомедичних досліджень з використанням тварин» і Хельсінкської декларації 2000 року про гуманне ставлення до тварин. Протоколи експериментів були схвалені Етичним комітетом ХНМУ. Під час роботи з лабораторними тваринами дотримувались «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001 р.), узгоджених з «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які застосовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985 р.).

До початку дослідження тварини містилися протягом місяця в ідентичних умовах, з достатньою кількістю їжі і води. Під час проведення досліджень тварини перебували на стандартному раціоні Експериментально-біологічної клініки.

2.2.1 Моделювання інфікованої ранової поверхні на лабораторних тваринах. До дослідження були залучені 90 мишей породи BALB/cJLacSto жіночої статі. На них була сформована модель інфікованої рани на правому боці з попереднім видаленням волосяного покриву. Перед нанесенням ранового дефекту проводилось знезараження оголеної ділянки шкіри 70% спиртом, після чого тваринам була проведена інфільтраційна анестезія шляхом підшкірного введення лідокаїну («Лідокаїн буфус» 2% 0,2 мл, Обновление ПФК, Росія).

На першу добу частині мишей внутрішньошкірно вводилося 0,1мл суспензії з *S.aureus* у фізіологічному розчині, а на другу добу в інфільтрат, що утворився вводили 0,5 мл ОЩ за McFarland з концентрацією мікробних клітин $3,8 \pm 0,1 \times 10^8$ в 0,05 мл фізіологічного розчину. Іншим мишам у такий же спосіб вводили 0,1 мл суспензії *P.aeruginosa* в фізіологічному розчині з концентрацією мікробних клітин $1,5 \pm 0,1 \times 10^8$. Експериментальну модель локалізованої інфекції відтворювали на активних здорових тваринах, голкою G = 30. Бактеріальна суспензія мала кімнатну температуру; розчин вводився повільно.

Через добу після інфікування (3 день експерименту) лабораторні миші

були випадковим чином розділені на 9 груп. У кожній групі було по 10 тварин ($n=10$, тому що ця кількість є мінімально допустима в загальноприйнятому сенсі для статистичної обробки та отримання достовірних результатів, а також достатньою для досягнення мети і вирішення завдань дослідження. Експериментальні групи були такі:

- 1 група – інтактні;
- 2 група – інфікована *Ps. aeruginosa* – контроль нелікований;
- 3 група – інфікована *Ps. aeruginosa* з використанням гелю з нізин;
- 4 група – інфікована *Ps. aeruginosa* з використанням гелю з нізином та діклофенаком;
- 5 група – інфікована *St aureus*. – контроль нелікований;
- 6 група – інфікована *St aureus* з використанням гелю з нізином;
- 7 група – інфікована *St aureus* з використанням гелю з нізином та діклофенаком;
- 8 група – інфікована *Ps. aeruginosa* з використанням мазі «Левомеколь»;
- 9 група – інфікована *St aureus* з використанням мазі «Левомеколь».

Антимікробні препарати наносилися зовнішньо на утворене інфекційне вогнище один раз на добу на уражену ділянку, починаючи з 3 дня експерименту – тобто з другої доби після нанесення ран і їх інфікування - до 16 дня експерименту. Загальна тривалість лікування склала 13 діб.

2.2.2 Планометричні методи. Контролювання швидкості загоєння ран проводили з використанням спеціалізованого програмного забезпечення Wound Pro для iOS, що дозволяє визначати площу (мм^2) і периметр (мм) поверхневих дефектів. Для проведення вимірювань за даною методикою проводилося фотографування ран на строго контрольованій відстані від фотооб'єктива мобільного пристрою (контроль здійснюється програмним забезпеченням), що дозволяло виключити помилки в масштабуванні і

розрахунках.

Площа і периметр ран вимірювалися на 8 та 16 день експерименту. Для оцінки загоєння ран було використано кілька методів:

1. Лінійна швидкість загоєння ран (v , мм²/сут):

$$v = 2 \times (S_0 - S_t) \times (P_0 - P_t), \quad (2.1)$$

де:

- P_0 і S_0 – периметр і площа ранової поверхні при попередньому вимірі;
- P_t і S_t – периметр і площа ранової поверхні через проміжок часу t . В даному випадку, з 4 по 8 день експерименту $t=4$ доби, а з 8 по 16 день експерименту – $t = 8$ діб;

2. Відносне зменшення площі ран:

$$(\Delta S, \%): \Delta S = (S_0 - S_t) \times 100 S_0 \times t, \quad (2.2)$$

де:

- S_0 – площа ранової поверхні при попередньому вимірі;
- S_t – площа ранової поверхні через проміжок часу t . В даному випадку, з 4 по 8 день експерименту $t=4$ доби, а з 8 по 16 день експерименту – $t=8$ діб;

3. Відсоткова швидкість загоєння ран (w , %):

$$w(\%) = S_1 - S_t \times 100, \quad (2.3)$$

де:

- S_1 – початкова площа рани (до початку лікування - на 4 день експерименту),
- S_t – площа рани через проміжок часу t – на 8 і 16 день експерименту.

Використання трьох різних способів оцінки загоєння ран доцільно з метою кращої об'єктивності в інтерпретації отриманих результатів і

мінімізації помилок, тому що кожна з представлених методик має свої переваги і недоліки.

Обчислення відносного зменшення площі ран є методом, який широко використовується для оцінки загоєння поверхневих дефектів, однак при розрахунку цього показника не враховується периметр ран (рани з однаковою площею можуть мати різний периметр). Цей недолік відсутній в методі розрахунку лінійної швидкості загоєння ран. З іншого боку, в світовій літературі загальноприйнятим способом оцінки регенерації поверхневих дефектів є значення відсоткової швидкості загоєння ран. Даний показник є і найбільш інтуїтивно зрозумілим – чим ближче значення відсоткової регенерації ран до 100 %, тим більша частина дефекту вважається загоєною.

2.3. Методи біохімічного та імуноферментного аналізу

2.3.1. Методи біохімічного аналізу. Вміст сумарних метаболітів оксиду азоту (NO) в сироватці крові мишей визначали за методом L.C.Green із співавт. у модифікації В.О. Метельської та Н.Г.Гуманової.

Проведення аналізу. Сироватку крові розводили 96 % етиловим спиртом у співвідношенні 1 : 2, ретельно перемішували і центрифугували 15 хв. при 2000 об./хв. До 0,5 мл центрифугату додавали 0,5 мл 0,025 % розчину реактиву Гресса у 15 % оцтовій кислоті та 0,5 мл 0,8 % розчину хлористого ванадію. Проби інкубували 30 хв. при 37°C і вимірювали оптичну щільність на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 540 нм проти дистильованої води. Кількість сумарних метаболітів оксиду азоту розраховували за калібрувальним графіком, який будували паралельно з пробами, використовуючи розчин NaNO_2 . Вміст сумарних метаболітів визначали у мікромолях у мілілітрі сироватки (мкмоль/мл).

Вміст нітритів визначали за методом Т.В.Звягиної у модифікації В.О. Метельської та Н.Г.Гуманової.

Проведення аналізу. Сироватку крові розводили 96 % етиловим спиртом у співвідношенні 1 : 2, ретельно перемішували і центрифугували 15 хв. при 2000 об./хв. До 0,5 мл центрифугату додавали 0,5 мл 0,025 % розчину реактиву Грисса у 15 % оцтовій кислоті. Проби інкубували 30 хв. при 37°C і вимірювали оптичну щільність на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 540 нм проти дистильованої води. Кількість нітритів розраховували за калібрувальним графіком, який будували паралельно з пробами, використовуючи розчин NaNO_2 . Вміст нітритів визначали у мікромолях у мілілітрі сироватки (мкмоль/мл).

Вміст нітратів розраховували за різницею показників сумарних метаболітів та нітритів. Вміст нітратів визначали у мікромолях у мілілітрі сироватки (мкмоль/мл).

2.3.2. Методи імуноферментного аналізу. Кількісне визначення вмісту інтерлейкінів 1 β та 4 у сироватці крові мишей (тварин) проводили імуноферментним методом, який базується на сендвіч-технології, що характеризується двійним зв'язуванням біотинвмісних антитіл з досліджуваною речовиною.

Визначення рівня інтерлейкіну (ІЛ) 1 β у сироватці крові мишей проводили імуноферментним методом на аналізаторі «Labline-90» (Австрія) з використанням комерційної тест-системи виробництва фірми «ВекторБЕСТ» (Росія) згідно інструкції, яка надається до набору.

Проведення аналізу. У відповідні лунки спеціального планшета, який входив до складу набору, додавали по 100 мкл розчину для розведення проб та по 100 мкл калібрувальних розчинів, стандартів і дослідних зразків. Планшет інкубували 2 години при $t^\circ=37^\circ\text{C}$ на шейкері. Після цього лунки промивали 5 разів буфером для промивання, а потім у кожен лунку додавали по 100 мкл ІЛ-1 β кон'югата № 1 та інкубували 1 годину при $t^\circ=37^\circ\text{C}$ на шейкері. Потім лунки промивали 5 разів буфером для промивання і у кожен лунку додавали по 100 мкл кон'югата № 2. Планшет інкубували 30 хв. при $t^\circ=37^\circ\text{C}$ на шейкері, після цього лунки знову промивали 5 разів буфером для

промивання й додавали по 100 мкл субстратного розчину ТМВ і залишали на 30 хв. в темряві при кімнатній температурі. Реакцію зупиняли, додаючи у кожен лунку по 50 мкл стоп-реагента. Через 5 хв. вимірювали оптичну щільність кожної проби при довжині хвилі 450 нм (референс-фільтр 630 нм). Кількість ІЛ 1 β розраховували за калібрувальним графіком, який будували паралельно з пробами, використовуючи калібрувальні розчини, які додаються до набору. Вміст ІЛ 1 β визначали у пікограмах на мілілітр сироватки (пг/мл).

Визначення рівня інтерлейкіну (ІЛ) 4 у сироватці крові тварин проводили імуноферментним методом на аналізаторі «Labline-90» (Австрія) з використанням комерційної тест-системи виробництва фірми “ВекторБЕСТ” (Росія) згідно інструкції, яка надається до набору.

Проведення аналізу. У відповідні лунки спеціального планшета, який входив до складу набору, додавали по 100 мкл розчину для розведення проб та по 100 мкл калібрувальних розчинів, стандартів і дослідних зразків. Планшет інкубували 2 години при кімнатній температурі на шейкері. Після цього лунки промивали 5 разів буфером для промивання, а потім у кожен лунку додавали по 100 мкл ІЛ-4 кон'югата № 1 та інкубували 1 годину при кімнатній температурі на шейкері. Потім лунки промивали 5 разів буфером для промивання і у кожен лунку додавали по 100 мкл кон'югата № 2. Планшет інкубували 30 хв. при кімнатній температурі на шейкері, після цього лунки промивали 5 разів буфером для промивання й додавали по 100 мкл субстратного розчину ТМВ, залишали на 25 хв. в темряві при кімнатній температурі. Реакцію зупиняли, додаючи у кожен лунку по 100 мкл стоп-реагента. Через 5 хв. вимірювали оптичну щільність проб при довжині хвилі 450 нм (референс-фільтр 630 нм). Кількість ІЛ 4 розраховували за калібрувальним графіком, який будували паралельно з пробами, використовуючи калібрувальні розчини, які додаються до набору. Вміст ІЛ 4 визначали у пікограмах на мілілітр сироватки (пг/мл).

2.4. Статистична обробка результатів досліджень

Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою програмного комплексу *Microsoft Excel*. Дослідження кореляційного взаємозв'язку між показниками виконувалися за методом Пірсона.

Для перевірки нормальності розподілення використовували тест Колмогорова-Смірнова. Даний непараметричний критерій використовується для перевірки належності вибірки деякому закону розподілення. Принцип методу полягає в статистичному аналізі вигляду:

$$D_n = \sup_x |F_n(x) - F(x)|, \quad (2.4)$$

де:

$\sup S$ – точна верхня грань множини S ;

$F_n(x)$ – функція розподілення сукупності, що досліджується;

$F(x)$ – функція нормального розподілення.

Інтерпретація значень критерію Колмогорова-Смірнова проводили на основі аналізу D статистики. Якщо D статистика значима ($P < 0,05$), то гіпотеза про те, що співвідносне розподілення нормально, відкидається.

Критерій Колмогорова-Смірнова розраховується за допомогою спеціальних математичних програм. В даному випадку статистичний аналіз проводили за допомогою математичного пакету *Statgraphics Centurion XVI*. Результати для всіх рядів даних показали $P > 0,05$. Це свідчить про те, що наведене розподілення не відрізняється від нормального и для нього можна застосовувати методи параметричної статистики.

Іншим важливим статистичним показником є стандартна помилка середнього (*SEM*). Вона характеризує цілісність та однорідність вибірки. Даний показник визначали за формулою:

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}}, \quad (2.5)$$

де:

s – стандартне відхилення по виборці;

n – число спостережень у виборці.

Стандартне відхилення s розраховували як корінь квадратний з дисперсії випадкової величини:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{cp.})^2}{n-1}}, \quad (2.6)$$

де:

s – стандартне відхилення по виборці;

n – розмір вибірки;

x_i – величина окремого значення вибірки;

$x_{cp.}$ – середнє арифметичне вибірки.

Стандартне відхилення та стандартну помилку середнього розраховували із застосуванням електронних таблиць *Microsoft Excel*.

Для перевірки статистичної значимості відмінностей між контрольними та дослідними зразками використовували одно вибірковий t -критерій Стьюдента:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S_{\bar{x}_1} - S_{\bar{x}_2}}}, \quad (2.7)$$

де:

\bar{x}_1 – середнє значення контрольної вибірки;

\bar{x}_2 – середнє значення дослідної вибірки;

$S_{\bar{x}_1}$ – стандартна помилка середнього контрольної вибірки;

$S_{\bar{x}_2}$ – стандартна помилка середнього дослідної вибірки.

На основі розрахованого t -критерію з таблиці підбирали відповідне значення вірогідності P .

2.5. Гістологічні методи

Матеріалом для морфологічного дослідження послужили такі тканини лабораторних тварин, як шкіра, підшкірна клітковина, м'язи, які були висічені із стегна мишей всіх досліджуваних груп в зоні внутрішньошкірного введення бактеріальної суспензії на 16 добу експерименту.

Матеріал піддавали спиртовій проводці і парафіновій заливці. Оглядові препарати для загальної оцінки стану досліджуваних тканин були забарвлені гематоксиліном і еозином. Фарбування препаратів фукселіном на еластичні волокна з дофарбуванням піккрофусіном використовувалось для виявлення та диференціювання сполучнотканинних структур. Для оцінки функціональної активності тканин використовували комплекс гістохімічних методик.

Гістологічні та гістохімічні методики виконувалися за прописами, викладеним в інструкціях по гістологічній техніці і гістохімії.

Вивчення препаратів, забарвлених гістологічними і гістохімічними методами проводилося на мікроскопі Olympus BX-41 з використанням програм Olympus DP-Soft (Version 3:1).

РОЗДІЛ 3

ВИВЧЕННЯ БАКТЕРИЦИДНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СРІБЛОВМІСНИХ АНТИСЕПТИКІВ ТА КОМПОЗИЦІЙ НІЗИНА В ЕКСПЕРИМЕНТІ *IN VITRO*

Неоднозначність даних, наведених в огляді літератури примушує дослідників постійно повертатися до вивчення даного питання. Зважаючи на це, було ухвалено рішення провести мікробіологічні дослідження *in vitro* із застосуванням антимікробних препаратів різного типу. Основною метою даних досліджень було визначення максимальної протимікробної активності фармакологічних сумішей. В якості останніх були вибрані: розчин колоїдного срібла (GreenPower (Україна), заявлена виробником концентрація 600 мг/л); розчин AgNO_3 ($C = 600$ мг/л), фармакологічні композиції нізину та ектерициду.

3.1 Вивчення затримки росту мікроорганізмів, збудників гнійно-запальних локалізованих процесів

Антимікробна дія препаратів вивчалася по відношенню до *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa*. Використовувалися чисті добові культури мікроорганізмів, що виростили на щільному живильному середовищі. Дослідження по вивченню антимікробної дії *in vitro* проводили методом колодязів (метод дифузії в агар) [154]. Для цього незначну кількість мікроорганізмів обережно переносили петлею з поверхні колоній в пробірку із стерильним м'ясопептонним бульйоном (МПБ). Суспензію досліджуваного матеріалу готували за стандартом каламутності так, щоб її концентрація відповідала показникам кожного конкретного мікроорганізму в КУО/мл (табл.3.1). Для реєстрації оптичної щільності мікробних суспензій використовували автоматичний мутномір Densi-La-Meter.

Ріст мікроорганізмів здійснювалося в чашках Петрі на агарі Мюллера-

Хинтона. Для цього 38 г порошку M173 компанії HIMEDIA (Індія) розчиняли в 1000 мл дистильованої води, до повного розчинення, після чого стерилізували в автоклаві при 1,1 Атм і 120 °С впродовж 15 хв. Після стерилізації в стерильну чашку Петрі встановлювали циліндри з неіржавіючої сталі діаметром 6 мм і заввишки 10 мм, потім навколо цих циліндрів розливали приготоване та охолоджене до 40 °С живильне середовище. Для отримання повного газону культури мікроорганізмів вносили 1 мл суспензії мікробної культури на 100 мл живильного середовища. Така методика дозволяє отримати оптимальну кінцеву концентрацію мікроорганізмів 10^7 КУО/мл.

Таблиця 3.1.

Шкала відповідності показників оптичної щільності мікробних суспензій (у одиницях McFarland) концентрації мікробних клітин КУО/мл

Групи	Мікроорганізми	Одиниці оптичної щільності по McFarland	Концентрація мікробних клітин/мл (M ± m)
II	<i>Staphylococcus spp.</i>	0,5	$3,8 \pm 0,1 \cdot 10^8$
		1,0	$5,3 \pm 0,1 \cdot 10^8$
		<u>2,0</u>	<u>$8,4 \pm 0,15 \cdot 10^8$</u>
		3,0	$1,2 \pm 0,2 \cdot 10^9$
		4,0	$1,5 \pm 0,2 \cdot 10^9$
III	<i>Pseudomonas spp.</i>	0,5	$1,5 \pm 0,1 \cdot 10^8$
		1,0	$3,0 \pm 0,15 \cdot 10^8$
		<u>2,0</u>	<u>$6,0 \pm 0,2 \cdot 10^8$</u>
		3,0	$9,0 \pm 0,3 \cdot 10^8$
		4,0	$1,2 \pm 0,3 \cdot 10^9$

Після охолодження агару, циліндри видаляли стерильним пінцетом, а в лунки, що утворилися, поміщали по 0,3 мл розчину антимікробного препа-

рату. Після 24 години інкубації в термостаті при 35 °С проводили аналіз результатів по зоні пригнічення росту, заміряною з точністю до 1 мм, включаючи діаметр лунок. При цьому не враховували дуже малі колонії тест-штамів та наліт на краю зони затримки росту [155].

Протимікробна дія досліджуваних препаратів реєструвалась шляхом вимірювання затримки росту популяції навколо колодязя в мм. Візуалізація проведення експерименту по вивченню антимікробної активності наведена на рис. 1a,b.



Рис. 3.1a. Контрольні зразки колонії *Pseudomonas aeruginosa*. В колодязі для антимікробної речовини внесений фізіологічний розчин хлориду натрія.



Рис. 3.1b. Вивчення пригнічення росту колонії *Pseudomonas aeruginosa*. В колодязі для антимікробної речовини внесений розчин нітрату срібла з концентрацією 600 мг/л.

На рисунку 3.1a видна повна відсутність затримки росту колонії навколо колодязів з фізіологічним розчином, при цьому в чашці Петрі, де в якості антимікробного засобу застосовується розчин AgNO_3 (рис. 3.1b) можна спостерігати явне пригнічення розмноження *Pseudomonas aeruginosa*.

Затримка росту в даному випадку складає близько 20 мм (середнє значення). Так само проводилися дослідження з іншими антимікробними препаратами, як для вивчення затримки росту *Pseudomonas aeruginosa* так і для *Staphylococcus aureus*. Співвідношення компонентів сумішей і результати затримки росту наведені в табл. 3.2.

Таблиця 3.2

Склад антимікробних засобів та результати затримки росту
мікроорганізмів

№ зразку	Склад	Затримка росту, мм	
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
1	Карбопол – 0,1 г; NH ₄ OH 10 % – 1 мл; Ектерицид – 9,4 мл	–	–
2	Карбопол – 0,2 г; NH ₄ OH 10 % – 0,5мл; Ектерицид – 4,3 мл; Нізин – 0,2 г	17	12
3	Карбопол – 0,2 г; NH ₄ OH 10 % – 0,4 мл; Дист. вода – 9,5 мл; Ектерицид – 4,3 мл; Нізин – 0,3г	15	13
4	Карбопол – 0,5 г; NH ₄ OH 10 % – 0,5 мл; Ектерицид – 4,3 мл; Нізин – 0,2 г; Фіз. розчин – 10 мл	18	12
5	КМЦ – 1 г; Ектерицид – 50 мл; Дист. вода – 50 мл;	–	–
6	Колоїдне срібло GreenPower (600 мг/л)	–	–
7	Розчин AgNO ₃ (600 мг/л)	20	16

На основі проведених досліджень можна зробити наступні висновки. Найбільшу антимікробну дію проявляє розчин 8 в концентрації 600 мг/л. Трохи нижче активність спостерігається у сумішей № 2,3 і 4, що складаються з карбопола, ектерицида та нізина. Зразки № 1,5 з ектерицидом, а також зразок № 6, який є розчином колоїдного срібла, не проявили антимікробної

дії.

Гідроксид амонія в зразках № 1–4 застосовувався для полімеризації гелю з карбополом. У сумішах № 5–7 в якості основи гелю використовували карбоксиметилцелюлозу (КМЦ).

Таким чином, аналіз проведених досліджень показав наявність анти-мікробної активності у препаратів, які мають в своєму складі нізин та нітрат срібла. Решта препаратів не проявляє бактерицидних властивостей. Даний ефект можна пояснити виробленням резистентності клінічних штамів мікроорганізмів до діючих речовин, що діють, обумовленою їх багаторічним застосуванням в медичній практиці.

Незважаючи на наявність антимікробних властивостей у нітрата срібла та нізина, механізм їх впливу на мікроорганізми не цілком зрозумілий, а можливість цитотоксичної дії і алергічного впливу AgNO_3 змушує схилитися до застосування більш безпечних бактериоцинів, тим більше, що активність представлених препаратів приблизно однакова.

Таким чином, наступним етапом проведення досліджень було визначення оптимальної концентрації нізина в фармакологічних композиціях.

3.2 Визначення оптимальної концентрації нізина

Антимікробна активність вивчалася по відношенню до хвороботворних штамів *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa* експериментальної суміші наступного складу: 10% NH_4OH – 5 мл; карбопол – 0,2 г; нізин – 0,05 – 0,3 г; $\text{H}_2\text{O}_{(\text{дист.})}$ – до 10 мл. Використовувалися чисті добові культури мікроорганізмів, які вирости на щільному живильному середовищі. Дослідження з вивчення антимікробної дії *in vitro* проводили методом дифузії в агар [156]. Для підготовки мікробних суспензій використовували автоматичний мутномір Densi-La-Meter. Ріст мікроорганізмів здійснювався в чашках Петрі на агарі Мюллера-Хинтона. Аналіз результатів проводили по

зоні пригнічення росту, виміряною з точністю до 1 мм, включаючи діаметр лунок. Результати досліджень представлені на рис. 3.2.

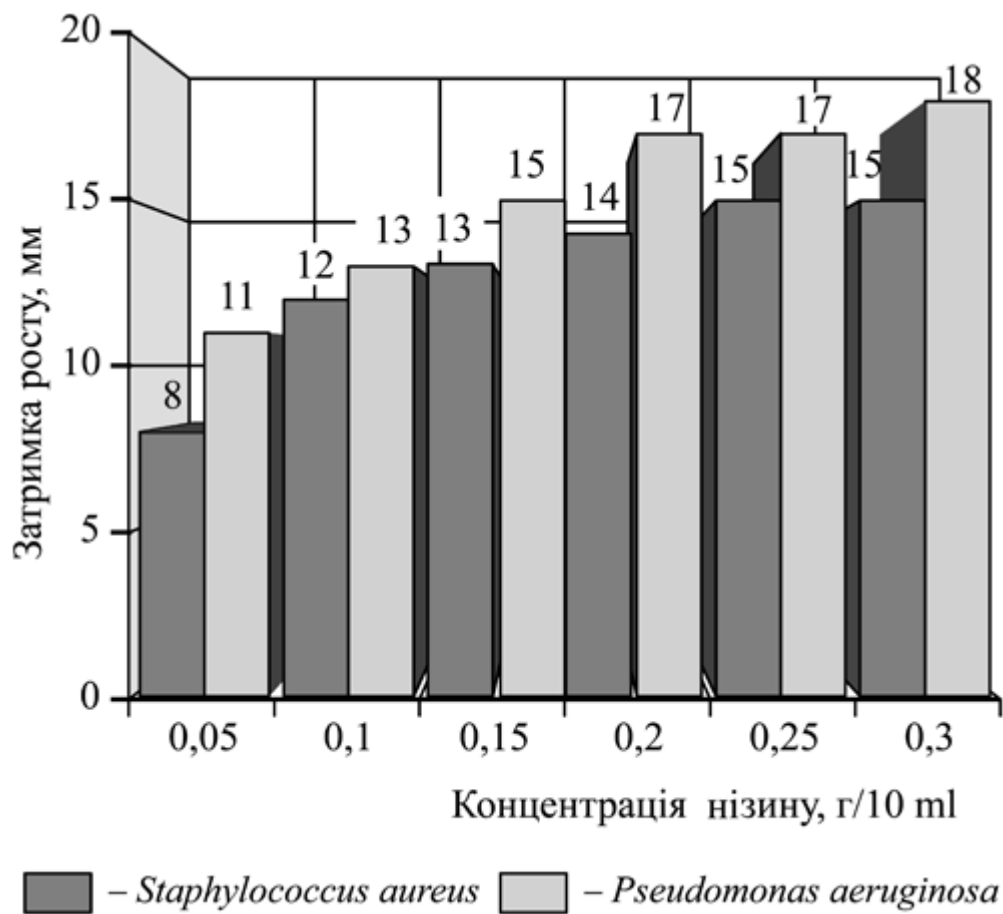


Рис.3.2. Залежність показника затримки росту *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa* від концентрації нізину

Наведені дані показують, що зі збільшенням концентрації нізину зростає також показник затримки росту мікроорганізмів, а експонентний характер залежностей свідчить про наявність деякого оптимального значення, після якого приріст затримки росту істотно знижується [157]. В даному випадку приріст пригнічення розмноження бактерій як для *Staphylococcus aureus* так і *Pseudomonas aeruginosa* помітно зростає при впливі на них нізину в кількості до 0,2 – 0,25 г, після чого приріст показника затримки росту знижується. Це дозволяє зробити висновок, що для ефективного застосування нізину як антимікробного засобу проти

Staphylococcus aureus і *Pseudomonas aeruginosa* вистачить 0,2 – 0,25 г даного препарату. Подальше збільшення його концентрації, в даному випадку, не доцільне.

Для підвищення протизапальних властивостей наведеної суміші, до складу гелю додавали 30 мл 2.5%-ного розчину диклофенаку. Таким чином отримали суміш наступного складу: 70 мл H₂O; 2 г карбополу; 5 мл 10%-ного NH₄OH; 30 мл 2,5% розчину диклофенаку. Мікробіологічну активність даного гелю досліджували вимірюванням затримки росту навколо колодязя на *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* та *Escherichia coli*. Результати досліджень наведені на рис. 3.3.

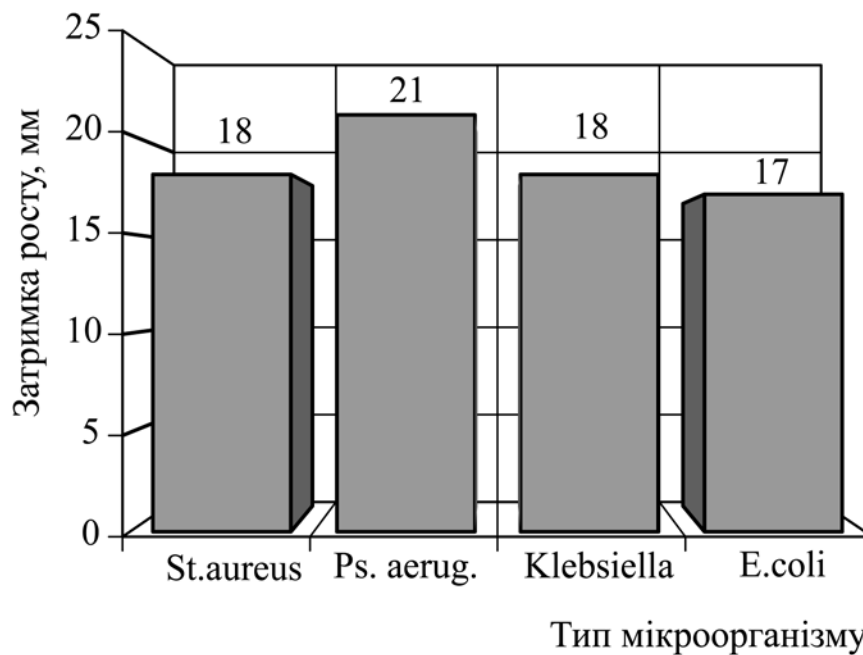


Рис.3.3. Залежність показника затримки росту деяких мікроорганізмів від концентрації гелю з додаванням диклофенаку.

Дані на рис. 3.3 показано, що додавання диклофенаку підвищує протимікробну активність суміші, причому найбільший вплив спостерігається на зразок *Pseudomonas aeruginosa*.

Висновки до розділу 3:

1. Колоїдне срібло GreenPower в концентрації 600 мг/л не впливає на пригнічення росту *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas*.
2. Нітрат срібла AgNO_3 в концентрації 600 мг/л пригнічує ріст вищенаведених мікроорганізмів з максимальною ефективністю.
3. Композиції з ектерицидом без нізину не пригнічують ріст досліджених мікроорганізмів.
4. Фармакологічні суміші з нізином гальмують ріст мікроорганізмів, причому ефективність пригнічення можна порівняти з ефективністю нітрата срібла.
5. На ефективність пригнічення росту мікроорганізмів більш впливає не концентрація активної речовини, а методика приготування препарату. Так, на у зразка №4 менша концентрація нізину, ніж у зразка №3, проте антимікробна активність зразка №4 вища по відношенню до суміші №3.
6. Найбільш позитивний ефект надає суміш: карбопол – 0,5 г; NH_4OH 10 % – 0,5 мл; ектерицид – 4,3 мл; нізин – 0,2 г; фізіологічний розчин – 10 мл.
7. Пригнічення *Pseudomonas aeruginosa* спостерігається більш суттєво, ніж *Staphylococcus aureus*.
8. Оптимальна концентрація нізину в композиції складає $0,2 \div 0,25$ г на 10 мл суміші. Підвищення цієї концентрації приводить до додаткової витрати нізину, при цьому ефективність пригнічення суттєво не змінюється.
9. Модифікація композицій нізину додаванням диклофенаку позитивно впливає на антимікробну активність препарату, причому найбільше пригнічення спостерігається для *Pseudomonas aeruginosa*.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Mishyna Maryna, Burov Andrey, Vekshin Vitaliy, Grabovetskaya Evgeniya. Antibacterial effect of nisin *in vitro*. *Journal of Education*,

Health and Sport. 2020; №10. C. 332-338.

2. Mishyna Marina, Burov Andrey, Vekshin Vitaliy, Grabovetskaya Evgeniya. Evaluation of antimicrobial activity of some compounds for purulent wounds treatment. *Journal of Education, Health and Sport*. 2021; №3(11). C. 34-41.

РОЗДІЛ 4

ВИБІР ОСНОВИ ГЕЛІВ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ГНІЙНИХ РАН

Основи для гелів зазвичай готуються у вигляді індивідуальних форм або суміші різних речовин, які обумовлюють їх специфічні властивості.

Між лікарським компонентом і основою існують особливі взаємодії, які не дозволяють характеризувати її як окремий носій. Гелі необхідно розглядати як єдине ціле з основи та активної речовини. Одна й та ж лікарська речовина може надавати абсолютно різну дію в залежності від того, з якою гелевою основою вона скомбінована [158]. Так, наприклад, мазі багатьох антибіотиків на вазеліні малоактивні, в той же час гелі, приготовані на гідрофільній поліетиленгліколевій основі, мають виражену антибіотичну дію [159]. Мазева основа не просто інертний носій, а активний компонент мазі.

М'які лікарські засоби для зовнішнього застосування повинні відповідати наступним вимогам: мазі повинні бути однорідними; повинні мати певні реологічні показники – пластичність, в'язкість, період релаксації. Мазі також повинні мати: оптимальну дисперсність лікарських речовин; їх рівномірний розподіл; незмінність складу при зберіганні. Мазі повинні бути стабільні, без сторонніх домішок і з точною концентрацією лікарських речовин [160].

Основи, які б забезпечували максимальний терапевтичний ефект мазі, також повинні відповідати наступним вимогам: володіти здатністю для намазування, тобто мати необхідні структурно-механічні (консистентні) властивості: в'язкість, пластичність, текучість, тиксотропність та ін.; мати хорошу сумісність з лікарськими речовинами, тобто володіти абсорбуючими здібностями; не змінюватися під дією повітря, світла, температури та мати хімічну інертність, тобто не реагувати з розподіленими в них лікарськими речовинами; не повинні надавати подразнювальну та сенсibiliзуючу дію, але повинні сприяти збереженню первісної кислотності шкіри або слизової

оболонки; не підлягати контамінації мікроорганізмами; не повинні бруднити одяг, не бути надмірно липкими, легко змиватися за допомогою мила або без нього.

Властивості основи повинні відповідати меті призначення мазі: повинні швидко засихати і щільно прилягати до поверхні шкіри; основи для мазей, що діють поверхнево, не повинні мати здатність всмоктуватися, а основи для мазей резорбтивної дії, навпаки, повинні глибоко проникати в шкіру, досягати кров'яного русла і сприяти всмоктуванню лікарських речовин [161].

Підібрати мазеву основу, яка б повністю відповідала цим вимогам досить непросто. До сих пір, існує проблема з вибором матеріалу, який може використовуватися в якості носія для лікарських препаратів на всіх стадіях запального процесу.

На підставі наведеного вище огляду літератури видно, що в даний час для створення основ мазей найбільш перспективними є колоїдні розчини карбоксиметилцелюлози (КМЦ) та представника карбомірів – карбополу. Вони не токсичні, стійкі до світла, температури, і слабо піддаються біологічній контамінації [162]. Крім того, такі гелі, відрізняються високою осмотичним дією, що сприяє очищенню ран шляхом абсорбції їх вмісту і відторгнення некротичних мас. Мазі на основі гелю мають такі позитивні ефекти, як охолодження шкірного покриву, зниження сверблячки, та можуть використовуватися при гострому запаленні [163,164]. Використання таких гелів особливо актуально в тих випадках, коли неможливо використовувати мазі на жировій основі, вони також є ідеальними для нанесення на слизові оболонки [165,166]. Дані речовини не є алергенами і не викликають шкірних реакцій. Також, в даний час досить великий інтерес виникає до багатоконпонентних композицій з добавками допоміжних речовин [167,168]. Використання модифікації сприяє підвищенню розчинності, збільшення в'язкості розчинів, підвищує біологічну доступність речовин, яка дозволить створити нові лікарські препарати з мінімальним вмістом діючих та допоміжних

речовин і більшою терапевтичною ефективністю, а також дозволяє оптимізувати деякі технологічні процеси [169,170].

Таким чином, метою даного етапу роботи було вибір речовини для створення гелевої основи м'якої лікарської форми для лікування гнійних уражень шкіри з нізином в якості активної речовини та визначення реологічних, структурно-механічних і фізико-хімічних властивостей отриманої композиції. З огляду на те, що даний гель надалі планується використовувати в якості носія препарату для лікування гнійних ран, наведені дослідження проводили спираючись на вимоги, які пред'являються до носіїв лікарських препаратів, а саме: речовина повинна мати необхідні консистентні властивості, не змінюватися під дією зовнішніх чинників, мати хімічну інертність, не чинити подразнюючої та сенсibiliзуючої дії, має зберігати первинний рН шкіри і слизової оболонки; не піддаватися контамінації; змиватися водою, не бути занадто липким [171].

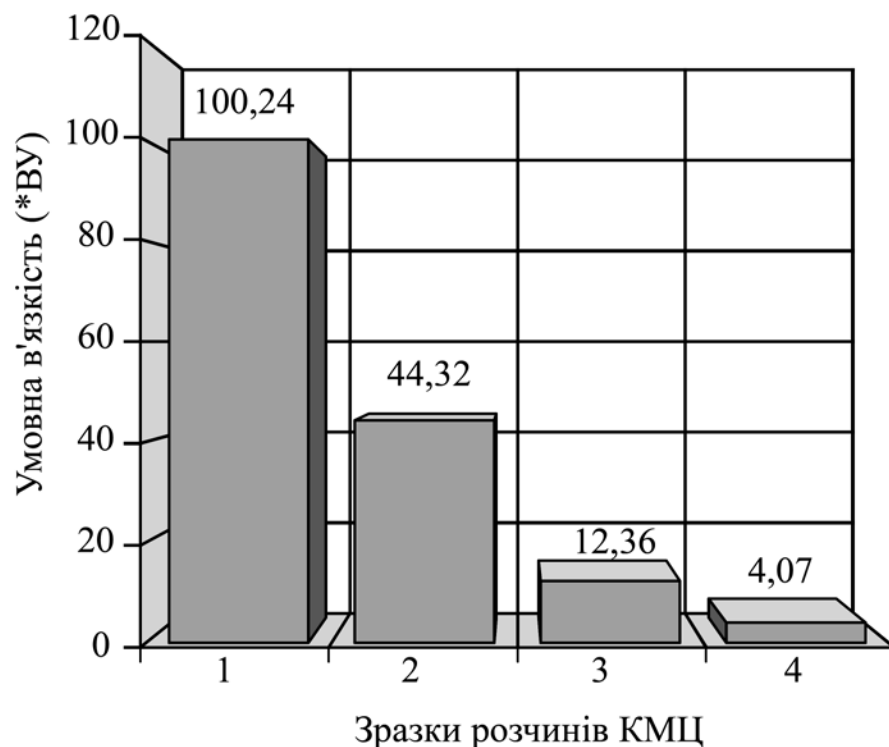
4.1 Приготування основ мазей та дослідження їх властивостей

4.1.1 Приготування гелю карбоксиметилцелюлози. Основний гель КМЦ готували за такою методикою: в залежності від запланованої концентрації розчину до необхідного обсягу дистильованої або деіонізованої води додавали потрібну кількість сухого порошку КМЦ. Суміш підігрівали до 70 °С одночасно перемішуючи механічною мішалкою до утворення однорідної желеподібної структури без наявності грудок та згустків.

4.1.2 Дослідження показників в'язкості розчину КМЦ. Одним з основних факторів, які впливають на структуру колоїдного розчину є його в'язкість, що, в свою чергу залежить від ряду технологічних параметрів, зміна яких зумовлює кінцеві властивості отриманого гідрогелю [172].

Визначення умовної в'язкості здійснювали за допомогою віскозиметра ВБР-1 шляхом вимірювання секундоміром тривалості витікання розчину з отвору діаметром 5 мм. Така методика дозволяє отримати дані умовної

в'язкості шляхом визначення тривалості витікання гелю відносно до тривалості витікання такої ж кількості дистильованої води. Дослідження проводили на колоїдних розчинах чистої карбоксиметилцелюлози і на розчинах з додаванням гліцерину, аскорбінової кислоти та їх суміші. Початкова концентрація КМЦ становила 5%. Дослідження проводилися в лабораторних умовах при кімнатній температурі. Результати наведені на рис. 4.1.



1 – 5% КМЦ; 2 – 5% КМЦ + 2% гліцерин;

3 – 5% КМЦ + 1% аскорбінова кислота;

4 – 5% КМЦ + 1% аскорбінова кислота + 1% гліцерин

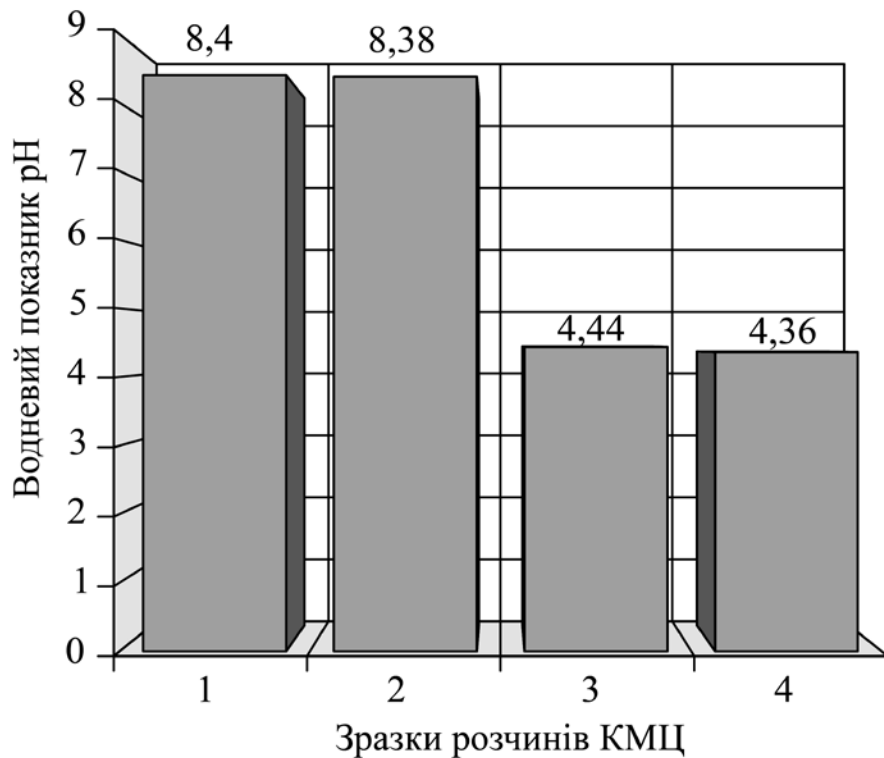
Рис. 4.1. Залежність умовної в'язкості від способу приготування розчину

Як видно з діаграми, найбільшу умовну в'язкість має 5% розчин КМЦ в воді. Додавання гліцерину знижує умовну в'язкість більш ніж в 2 рази. Ще меншу в'язкість мають розчини, які були модифіковані аскорбіновою кислотою, при цьому додавання в такий розчин гліцерину робить розчин

занадто рідким і неможливим для використання в якості основи для мазей.

Відомо [173,174], що структурна в'язкість гелів підвищується паралельно зі збільшенням їх концентрації, молекулярної маси, природи речовини та рН середовища, тому наступним кроком було дослідження впливу цих показників на фізико-хімічні властивості гелю. Вивчалися такі властивості гелю, як зовнішній вигляд, колір, запах, рН, вплив температури та агрегативна стабільність при тривалому зберіганні.

4.1.3 Дослідження кислотності розчину КМЦ. Водневий показник рН визначали на рН-метрі марки Eutech-510. На рис. 4.2 наведено залежності впливу природи модифікатора на рН отриманих розчинів.



1 – 3% КМЦ; 2 – 3% КМЦ + 2% гліцерин;

3 – 3% КМЦ + 1% аскорбінова кислота;

4 – 3% КМЦ + 1% аскорбінова кислота + 2% гліцерин

Рис. 4.2. Залежність рН розчину від способу його приготування.

Дані, наведені на рисунку показали, що зразки, виготовлені з чистої КМЦ або модифіковані гліцерином мають слаболужне середовище. Їх рН майже не відрізняється і знаходиться в районі 8,40. Додавання аскорбінової кислоти призводить до різкого зниження водневого показника в 2 рази. Розчини, які були модифіковані аскорбатами та їх сумішшю з гліцерином також мають майже однаковий рН, який знаходиться в слабокислотній області та коливається від 4,44 для розчину з додаванням аскорбінової кислоти, до 4,36 – в розчині, який був приготований з її суміші з гліцерином. Такі дані явно свідчать про те, що основний внесок в кислотність середовища вносить саме аскорбінова кислота, тоді як внесок КМЦ і гліцерину є несуттєвим.

4.1.4 Залежність в'язкості розчину КМЦ від температури. Відомо, що розчинення КМЦ безпосередньо залежить від температури розчинника, тому наступним кроком наукової роботи було дослідження залежності в'язкості гелю від температури води і визначення функції процесу розчинення за допомогою регресійного аналізу. Дослідження проводили на 5% розчині карбоксиметилцелюлози без модифікаторів за допомогою віскозиметра, одночасно реєструючи температуру термометром. Обробку результатів проводили в статистичній програмі Statgraphics Centurion XVI. Результати експериментальних досліджень наведені в таблиці. 4.1, а розрахунки регресійного аналізу на рис. 4.3.

Результати регресійного аналізу показали, що в'язкість колоїдного розчину КМЦ знижується з підвищенням температури розчинника, а функція цього процесу підпорядковується квадратичної залежності. Однак якщо температурний інтервал незначний, для визначення в'язкості гелю можливо застосовувати класичні методи інтерполяції.

Наведені дослідження дозволяють оптимізувати температурні умови розчинення КМЦ для утворення гелю потрібної консистенції.

Таблиця 4. 1

Залежність умовної в'язкості гелю, приготованого з чистої КМЦ, від температури розчинника (H₂O)

T _{КМЦ} , °C	Тривалість витікання геля, сек	В'язкість умовна, *ВУ
43	49,7	4,69
42	56,3	5,31
40	58,3	5,50
38	62,5	5,90
36	66,0	6,23
34	67,0	6,32
32	68,6	6,47
30	72,5	6,84
28	74,9	7,07
26	79,6	7,51

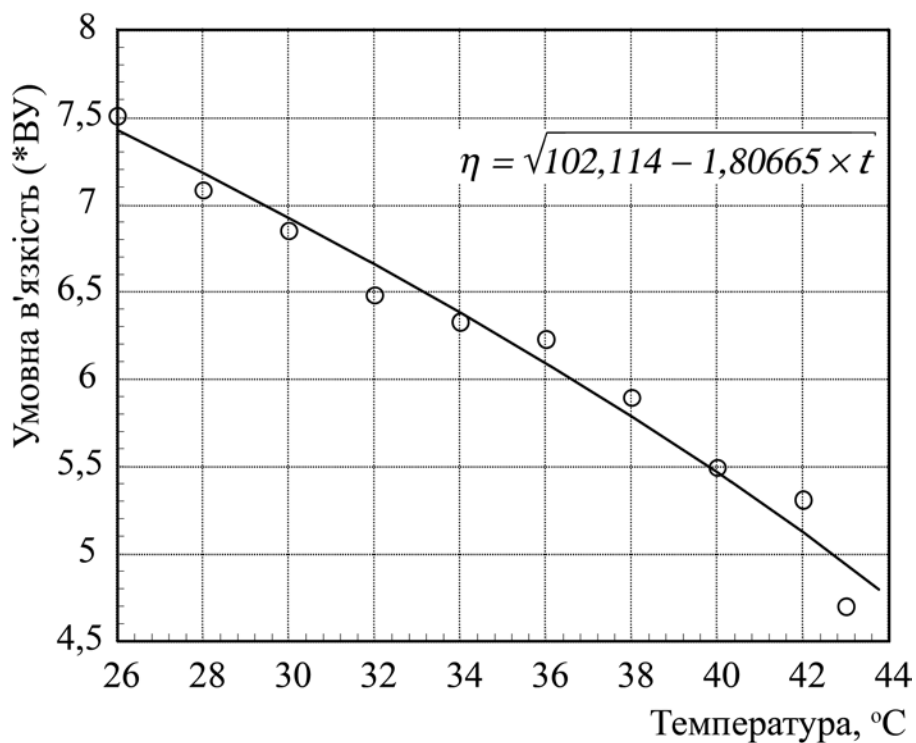


Рис. 4.3. Залежність умовної в'язкості гелю КМС від температури розчинника і результати регресійного аналізу

4.1.5 Залежність в'язкості розчину КМЦ від її концентрації. Не менш важливою складовою для створення композицій на основі КМЦ є її концентрація, від якої залежать не тільки фізико-хімічні властивості гелю, але й здатність розчину зберігати свою стабільність протягом потрібного терміну, тому наступним етапом було проведення досліджень щодо впливу концентрації КМЦ на в'язкість отриманого гелю [175]. Залежність умовної в'язкості гелю від концентрації КМЦ приведена в таблиці. 4.2.

Таблиця 4.2

Залежність умовної в'язкості гелю, приготованого без модифікаторів, від концентрації карбоксиметилцелюлози ($t_{\text{кімн}} = 18^{\circ}\text{C}$)

$T_{\text{КМЦ}}, ^{\circ}\text{C}$	Тривалість витікання гелю, сек	В'язкість умовна, *ВУ
0,5	81,5	4,69
0,25	26,1	2,46
0,125	15,6	1,47
0,060	12,5	1,18

При розрахунку необхідної кількості чистої КМЦ для приготування колоїдів з необхідними характеристиками потрібно вирішити непросте технічне завдання. Застосовувати віскозиметри для таких гелів неможливо через їх високу в'язкість, такі дослідження потребують специфічного обладнання, яке часто відсутнє в неспеціалізованих лабораторіях. Виходом з даного положення є отримання емпіричних залежностей в'язкості гелів, які побудовані із застосуванням малої кількості КМЦ. Такі розчини мають рідку консистенцію і цілком здатні пройти крізь отвір віскозиметра, однак їх практичне застосування в якості носіїв лікарських препаратів сумнівно через незадовільні механічні характеристики. Після отримання експериментальних даних та створення на їх основі регресивної моделі, останню можна сфокусувати на визначення в'язкості більш концентрованих розчинів. На рисунку 4.4 наведена графічна залежність в'язкості гелю від концентрації розчину і математична модель даного процесу.

Дані, наведені на рис.4.4 показали, що збільшення концентрації розчиненої КМЦ сприяє підвищенню умовної в'язкості гелю і ця залежність є квадратичною. Розрахована за допомогою регресійного аналізу емпірична функція дає можливість застосувати звичайні математичні засоби прогнозування умовної в'язкості гелів для різних концентрацій КМЦ, коли її визначення за допомогою віскозиметра є неможливим.

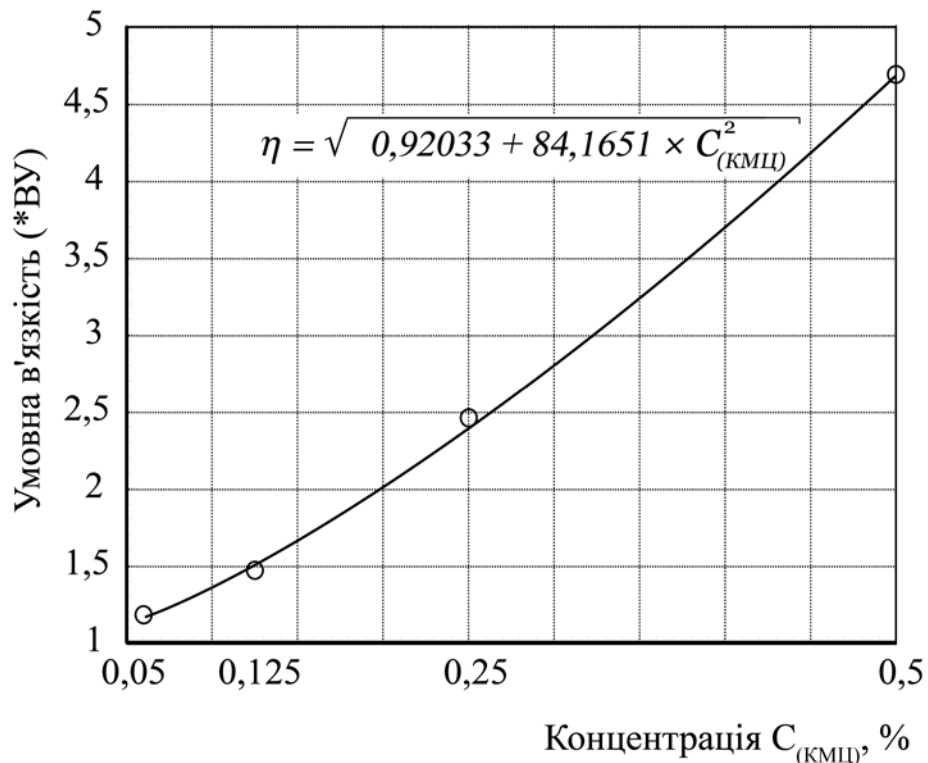


Рис. 4.4 Залежність умовної в'язкості гелю від концентрації КМЦ і результати регресійного аналізу

4.1.6 Зміна характеристик розчину КМЦ в залежності від тривалості зберігання. Стабільність лікарських гелів є однією з тих основних характеристик, які вказують на доцільність їх застосування [176]. Промислове виробництво та подальше використання даних гелів у вигляді комерційних препаратів, які швидко втрачають свою консистенцію позбавлене всякого сенсу. Тому наступний крок даної наукової роботи повністю присвячений визначенню стабільності отриманих колоїдів.

Основною метою наступного етапу досліджень було визначення

стабільності препарату старінням в нормальних умовах з подальшим прогнозуванням його терміну експлуатації. Оцінка стабільності досліджуваних зразків проводилася на основі таких показників якості як зовнішній вигляд, рН і в'язкість продукту. Також визначалася щільність розчинів, однак протягом усього терміну досліджень тут змін не спостерігалось, тому ці показники брали за константу. Дослідження проводилися до того моменту, коли починали спостерігатися істотні зміни наведених вище показників. Результати досліджень показані в табл.4.3.

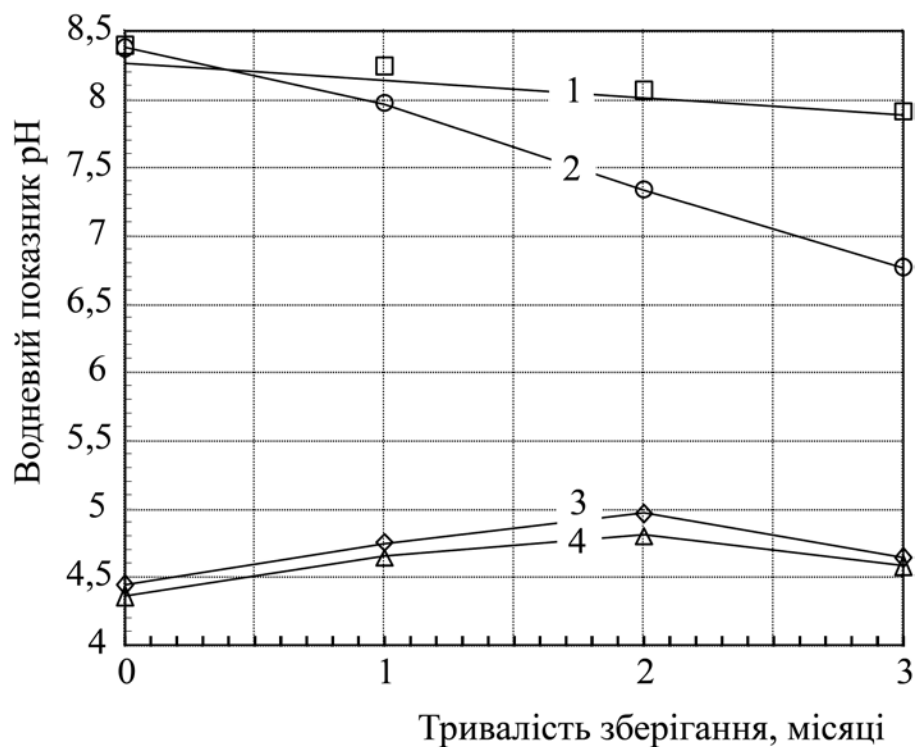
Таблиця 4.3

Зміна характеристик зразків гелю в залежності від терміну зберігання

Термін зберігання, міс	КМЦ		КМЦ + гліцерин		КМЦ + аскорб. к-та		КМЦ + аскорб. к-та + гліцерин	
	рН	V _{умов} , *ВУ	рН	V _{умов} , *ВУ	рН	V _{умов} , *ВУ	рН	V _{умов} , *ВУ
Початок	8,40	100,24	8,38	44,32	4,44	12,36	4,36	4,07
1	8,25	81,84	7,96	51,63	4,74	2,55	4,65	1,10
2	8,07	31,67	7,33	17,72	4,97	1,18	4,81	1,10
3	7,92	10,35	6,76	7,25	4,64	1,08	4,58	1,06
	Колір та запах не змінилися.		Колір змінився на жовтий. З'явився гнилісний запах.		Колір змінився на темно-жовтий. Спостерігається утворення слизу. Запах не змінився.		Колір змінився на темно-жовтий. Спостерігається утворення слизу. Запах не змінився.	

Як показали дослідження зовнішнього вигляду гелів, найбільш стабільним виявився розчин з чистою КМЦ без модифікації. Протягом всього терміну старіння (3 місяці) зовнішні показники цього гелю не змінилися. Модифікація даного розчину гліцерином сприяла тому, що розчин придбав блідо-жовтий колір і з'явився специфічний гнильний запах. Інші розчини відрізнялися від двох попередніх тим, що були приготовлені з додаванням

аскорбінової кислоти. Така модифікація надала первинним гелям жовте забарвлення, однак, при подальшому зберіганні колір досить потемнів і перетворився практично в коричневий, а в обсязі розчинів з'явилася слиз. Запах при цьому не змінився. Детальні дослідження величини водневого показника гелів протягом усього етапу старіння показали, що рН розчинів, які були приготовлені з КМЦ без модифікації, а також колоїдів з модифікацією гліцерином, поступово знижується (рис.4.5).



- 1 – 3% КМЦ; 2 – 3% КМЦ + 2% гліцерин;
 3 – 3% КМЦ + 1% аскорбінова кислота;
 4 – 3% КМЦ + 1% аскорбінова кислота + 2% гліцерин

Рис. 4.5. Залежність водневого показника рН від тривалості зберігання гелів

При цьому видно, що зниження кислотності на другому зразку більш виражено ніж в немодифікованому зразку. Тоді як водневий показник першого гелю знизився на 5,7%, проте залишився в слабо основний області, кислотність модифікованого гелю знизилася на 19,3% і змістилася з

слаболужної в слабокислої області.

Інший характер залежностей спостерігається у зразків, які були модифіковані аскорбіновою кислотою і її сумішшю з гліцерином. В цьому випадку водневий показник зростає впродовж двох місяців, після чого починається його зниження. Функції зміни рН для цих двох зразків мають лінійний вигляд і майже не відрізняються між собою: протягом двох місяців спостерігається рівномірний ріст водневого показника, після чого починається його рівномірне зниження. Втім коливання рН в цих розчинах є незначним і не перевищує 0,5 одиниць. Це доводить, що таким гелям вдається стабільно зберігати рН в межах слабокислої середовища. В цілому функції, які описують зміну рН отриманих гелів від тривалості зберігання наведені в табл.4.4. Функції наведені таблиці є лінійними, що вказує на рівномірну зміну кислотності гелів.

Таблиця 4.4

Регресійний аналіз функцій зміни рН отриманих гелів протягом терміну старіння

Розчин	Функція	
КМЦ	$pH = 8,403 - 0,162 \times \text{Міс}$ $R^2 = 99,86$	
КМЦ + Гліцерин	$pH = 8,431 - 0,549 \times \text{Міс}$ $R^2 = 99,39$	
КМЦ + Аскорбінова кислота	До 2 міс.	$pH = 4,45167 + 0,265 \times \text{Міс}$, $R^2 = 99,42$
	Після 2 міс.	$pH = 5,63 - 0,33 \times \text{Міс}$
КМЦ + Аскорбінова кислота + Гліцерин	До 2 міс.	$pH = 4,38167 - 0,225 \times \text{Міс}$ $R^2 = 97,29$
	Після 2 міс.	$pH = 5,27 - 0,23 \times \text{Міс}$

Наступним кроком на етапі визначення стабільності отриманих колоїдів були дослідження зміни в'язкості зразків протягом терміну зберігання. Можна стверджувати, що дані дослідження були базовими серед проведених випробувань з огляду на те, що в'язкість є основною

характеристикою, яка визначає якість отриманих гелів. Аналіз наведених у табл. 4.3 даних показав, що тенденція зміни в'язкості гелів, які були модифіковані аскорбіновою кислотою, істотно відрізняється від розчинів, які були приготовлені тільки з використанням КМЦ і гліцерину, тому функції даних процесів розглядалися окремо. На малюнку 4.6 наведено графічні залежності зміни умовної в'язкості (*ВУ) гелів, які були отримані з чистою КМЦ і модифіковані гліцерином. Наведені криві показують, що старіння гелів, які були приготовлені без використання аскорбінової кислоти, протягом першого місяця перебігає повільно. В'язкість зменшується несуттєво, а на зразку, який був модифікований гліцерином, навіть трохи збільшується. Потім, до другого місяця спостерігається різке зниження в'язкості в 2,5–3 рази від початкових значень, після чого падіння знову сповільнюється. Загальний вигляд функцій цього процесу можна представити як сигмоїдальні залежності з виходом на асимптоту.

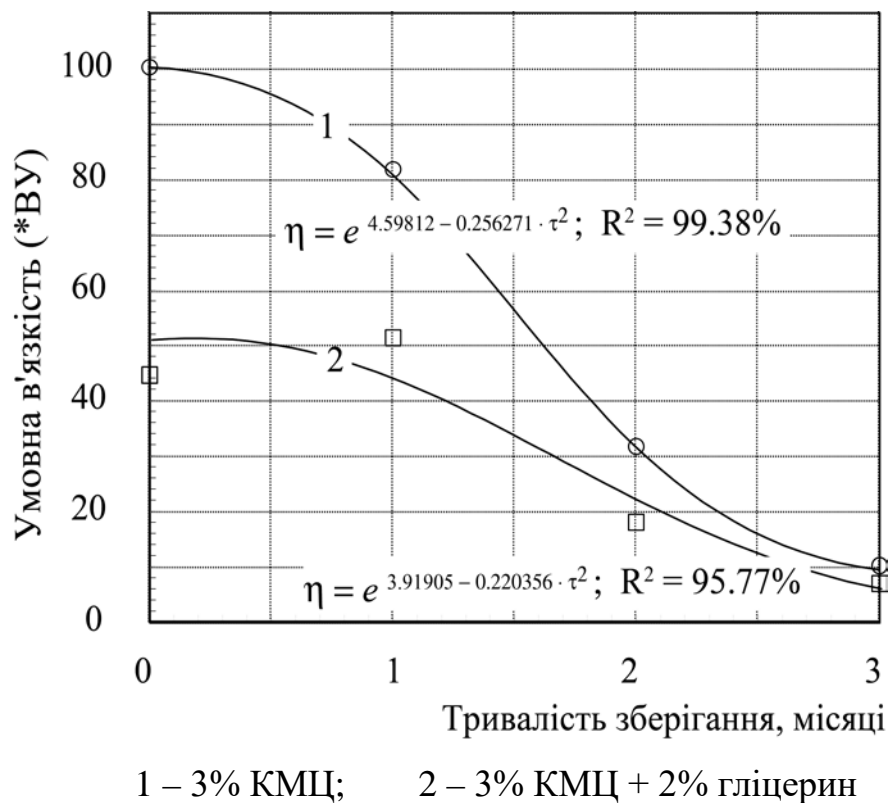


Рис. 4.6. Залежність умовної в'язкості від тривалості зберігання гелів, приготованих без додавання аскорбінової кислоти

Проведений регресійний аналіз показав, що обидві залежності є експонентами, які досить детально можна описати за наведеними нижче моделями:

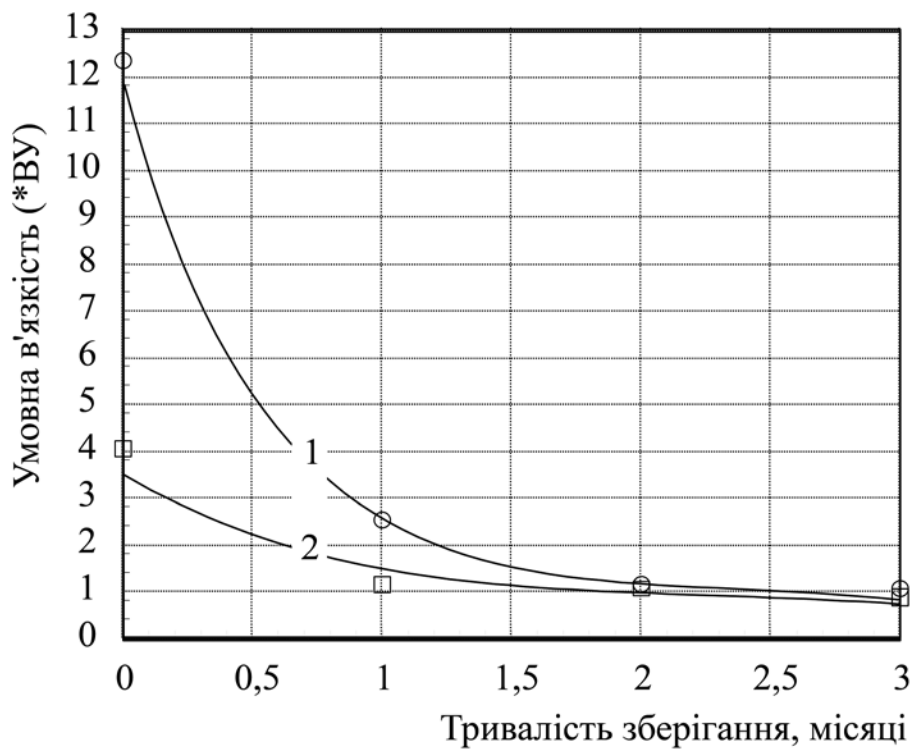
$$\text{Для гелю з КМЦ:} \quad \eta = e^{4,59812 - 0,256271 \cdot \tau^2} \quad R^2 = 99,38\% \quad (4.1)$$

$$\text{Для гелю з КМЦ + гліцерин:} \quad \eta = e^{3,91905 - 0,220356 \cdot \tau^2} \quad R^2 = 95,77\% \quad (4.2)$$

де: η – умовна в'язкість, *ВУ

τ – тривалість зберігання, міс.

Для зразків, які були модифіковані аскорбіновою кислотою притаманна інша специфіка старіння, графічна інтерпретація якої наведена на рис. 4.7.



1 – 5% КМЦ + 1% аскорбінова кислота;

2 – 5% КМЦ + 1% аскорбінова кислота + 2% гліцерин

Рис. 4.7. Залежність умовної в'язкості від тривалості зберігання гелів, приготованих за допомогою модифікації аскорбіновою кислотою.

Як показують наведені графічні залежності, розчини, які модифіковані аскорбіновою кислотою не тільки мають малу початкову в'язкість, яка майже в 10 разів нижче, ніж у гелів, без її додавання, але і схильні до різкого зниження в'язкості протягом досить короткого терміну зберігання. Уже за два тижні в'язкість таких розчинів знижується в 1,5-2,5 рази, а через 2 місяці цей показник можна прирівняти до в'язкості дистильованої води.

Математично наведені функції можна описати за наступними моделями:

$$\text{Для гелю з КМЦ:} \quad \eta = e^{2,4607-1,48321 \cdot \sqrt{\tau}} \quad R^2 = 97,96\% \quad (4.3)$$

$$\text{Для гелю з КМЦ + гліцерин:} \quad \eta = e^{1,25471-0,811889 \cdot \sqrt{\tau}} \quad R^2 = 85,71\% \quad (4.4)$$

На основі проведених досліджень можна зробити такі висновки:

1. Найбільш стабільними є розчини, які приготовлені з чистою КМЦ без застосування модифікаторів. Вони мають початкову в'язкість, яка найбільш повно відповідає вимогам, що пред'являються до фармацевтичних препаратів і зберігають свої властивості протягом місяця.

2. Додавання до наведеного розчину гліцерину майже не змінює його рН, проте знижує початкову в'язкість і сприяє зменшенню стабільності.

3. Розчин з гліцерином не стійкий до контамінації. Додавання аскорбінової кислоти змінює рН середовища в кислу область, що призводить до різкого зниження початкової в'язкості і прискоренню процесу синерезиса. Спроби скорегувати стабільність таких розчинів додаванням гліцерину не дали позитивного результату.

4.2. Приготування гелю на основі карбополу.

Гель на основі карбополу готували за наступною методикою: в залежності від запланованої концентрації розчину до необхідного обсягу дистильованої або деіонізованої води додавали потрібну кількість сухого

порошку карбополу. Суміш перемішували механічною мішалкою до утворення однорідної гелелеподібної речовини без наявності грудок та згустків. Після цього до отриманої суміші додавали 10% NH_4OH для нейтралізації водної суспензії.

4.2.1 Дослідження показників в'язкості розчину карбополу.

Після утворення гелю карбополу внаслідок його взаємодії з водою, кислотність колоїду складала $\text{pH} = 3$. Додавання гідроксиду амонію привело до поступової нейтралізації розчину та зсуву його pH в лужну сторону. При цьому спостерігалось значне збільшення в'язкості суспензії. Результати досліджень зміни в'язкості гелю в залежності від його кислотності наведені на рис. 4.8.

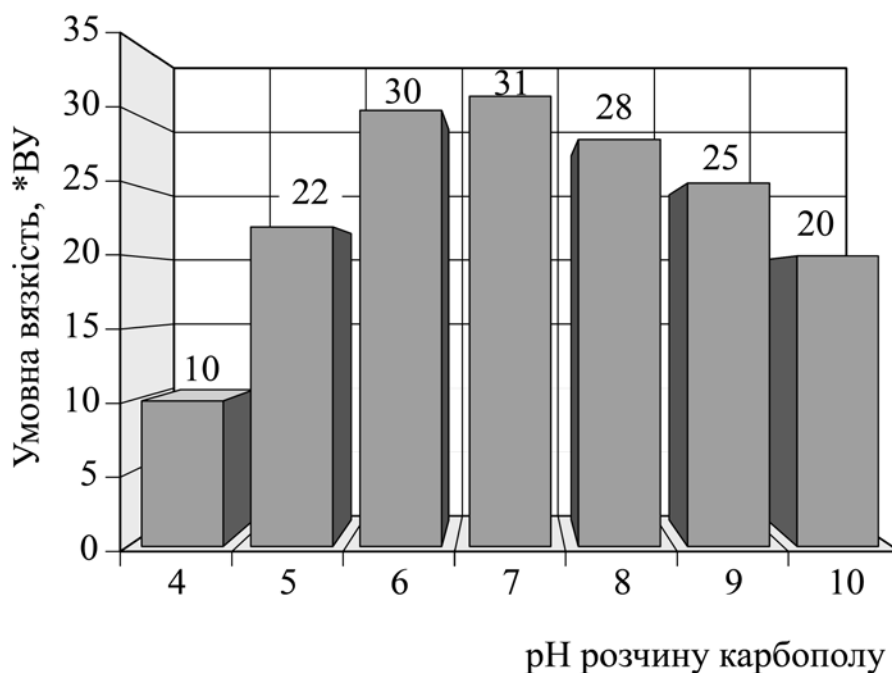


Рис.4.8. Залежність в'язкості розчину карбополу від рН.

На рисунку видно, що в'язкість розчину карбополу нелінійно зростає до $\text{pH} = 6-8$, тобто в область нейтрального середовища, після чого цей показник починає знижуватись. Таким чином, оптимальну в'язкість фармакологічного гелю на основі карбополу можна досягнути нейтралізацією суміші до значень нейтрального середовища. Взагалі, в

залежності від необхідної в'язкості препарату, значення водневого показника рН гелевої композиції може коливатись від 5 до 10 [177]. Ця невивагливість до меж кислотності може вважатись ще однією перевагою композицій на основі карбополу.

Наступним етапом роботи було з'ясування впливу концентрації та карбополу на в'язкість отриманого гелю. Досліди проводились як до додавання нейтралізатора, так і після нейтралізації 10%-ним NH_4OH . Результати досліджень наведені на рис. 4.9.

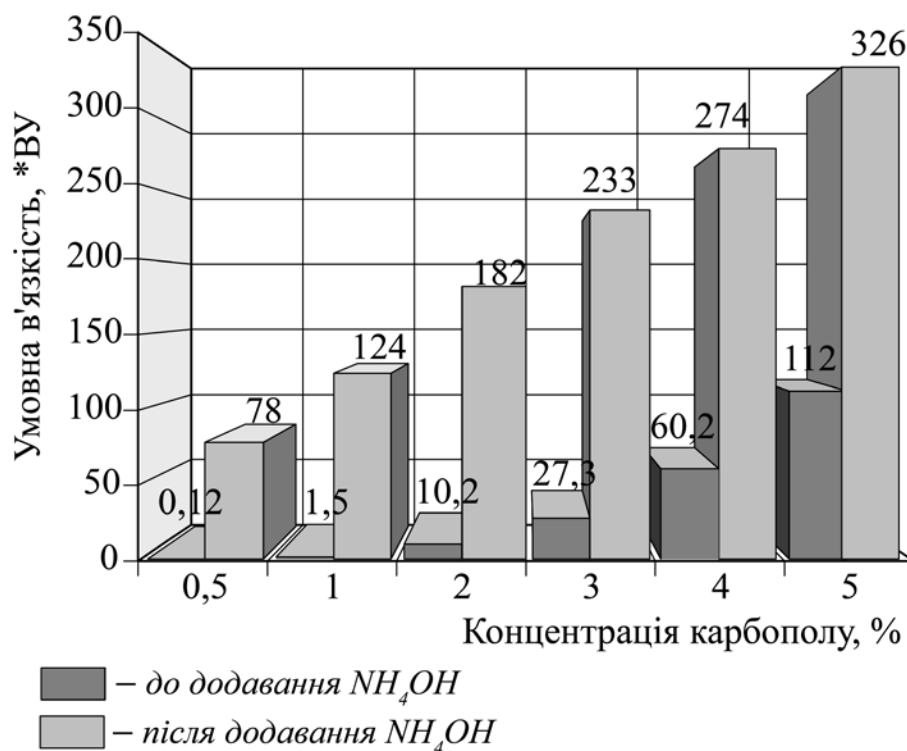


Рис.4.9. Залежність умовної в'язкості гелю від концентрації карбополу до, та після додавання нейтралізатора.

Дані на рис. 4.9 показали, що збільшення кількості гелеутворювача сприяє підвищенню умовної в'язкості гелю. Причому додавання нейтралізатора позитивно впливає на цей процес, значно збільшуючи умовну в'язкість. В обох випадках залежності підпорядковуються експонентним функціям. На зразках без додавання NH_4OH це $\eta = e^{0,137505+2,90782 \times \ln(C)}$; після

додавання нейтралізатора – $\eta = e^{4,79119+0,606923 \times \ln(C)}$. Як видно, функції мають однаковий вигляд і відрізняються лише коефіцієнтами, що свідчить про однакову природу протікання фізико-хімічних процесів як без нейтралізатора, так і сумісно з ним.

4.2.2 Дослідження впливу температури на в'язкість розчину карбополу

Вплив температури на в'язкість розчину карбополу досліджували шляхом його нагрівання на водяній бані та визначення в'язкості на віскозиметрі ВБР-1. Дані досліджень наведені на рис. 4.10.

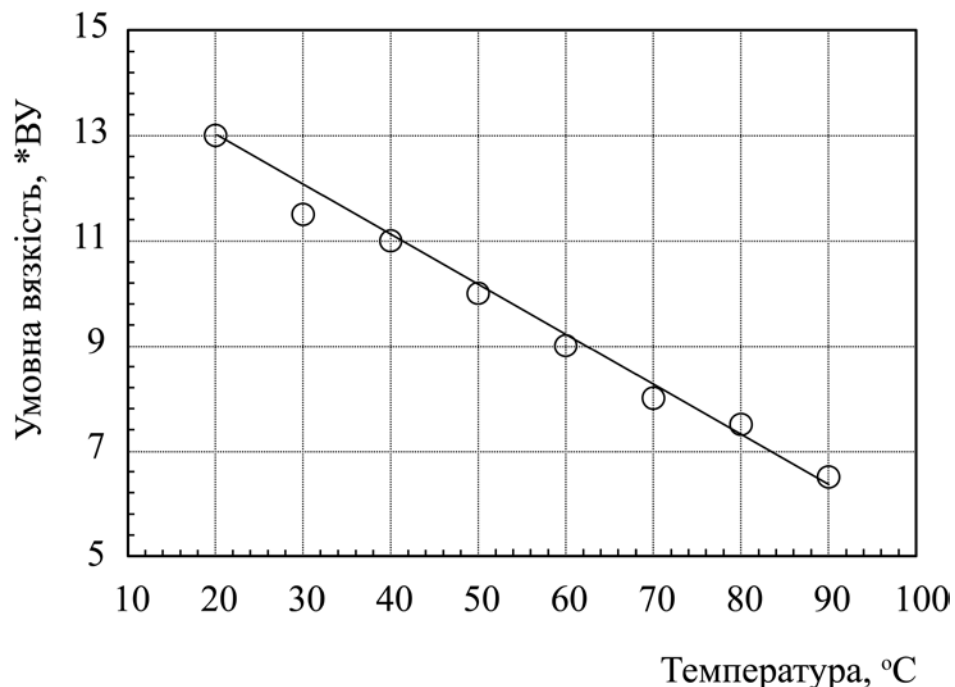


Рис. 4.10. Залежність умовної в'язкості від температури.

На рисунку видно, що умовна в'язкість розчину карбополу знижується прямопропорційно підвищенню температури. Проте зниження є незначним, при підвищенні температури в 4 рази умовна в'язкість знижується в два рази, а функція даного процесу має вигляд $\eta = 14,506 - 0,089881 \times t$.

4.2.3 Дослідження стабільності розчину карбополу

Кінетична стабільність отриманого розчину карбополу вивчалась

шляхом його витримування при нормальних умовах. Впродовж строку зберігання періодично вимірювались показники в'язкості та кислотності. Результати досліджень наведені на рис. 4.11.

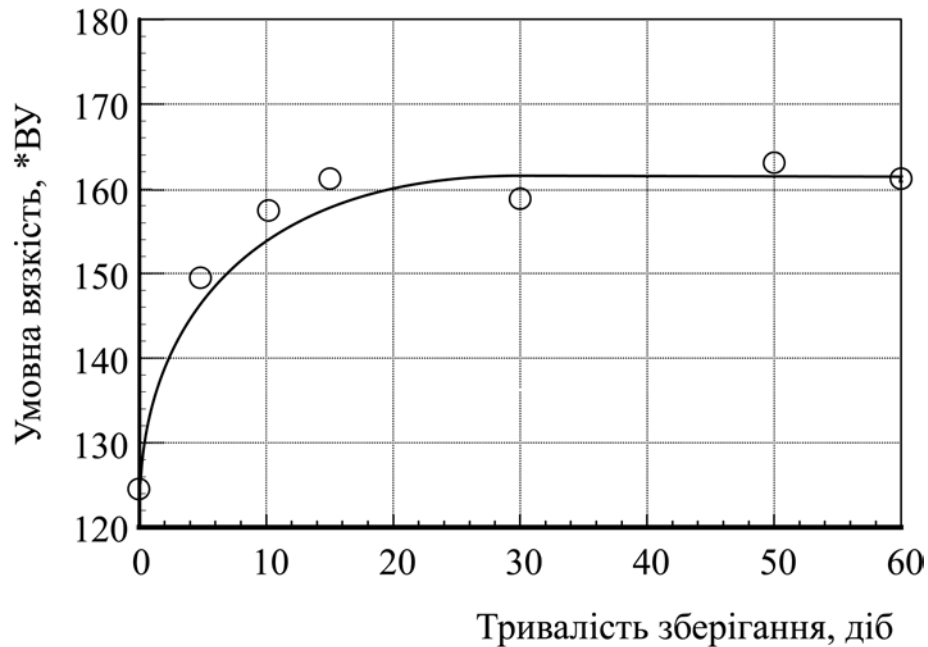


Рис. 4.11. Залежність умовної в'язкості від тривалості зберігання карбополу.

Дані на рисунку 4.11 показують, що тривалість зберігання впродовж двох місяців практично не впливає на умовну в'язкість розчину карбополу. Це дозволяє зробити висновок, що на відмінність від гелів карбоксиметилцелюлози, даний препарат можна використовувати в якості гелеутворювача для основи фармакологічних препаратів.

Висновки до розділу 4:

1. Додавання модифікаторів до розчинів КМЦ знижують їх в'язкість до таких характеристик, що використання даних композицій в якості м'яких лікарських форм стає неможливим.

2. Всі досліджувані розчини карбоксиметилцелюлози втрачають свою консистенцію, змінюючи фізико-хімічні характеристики впродовж трьох

місяців зберігання в звичайних умовах. Даний термін зберігання є недостатнім для комерційних лікарських засобів, а приведену технологію не можна пропонувати для створення фармацевтичних препаратів в промисловому масштабі [178].

3. Технологія приготування гелів з карбополу є простою, не вимагає багато часу та не потребує особливої кваліфікації робітників.

4. Для приготування гелю з карбополу потрібна незначна кількість сухої речовини, що знижує собівартість препаратів на його основі.

5. М'які лікарські форми на основі карбополу мають довготривалий термін зберігання, що сумісно з відповідними реологічними характеристиками, робить такі композиції придатними до використання в якості фармакологічних комерційних препаратів.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. М.М. Мішина, А.М. Буров, В.О. Векшин. Дослідження фізико-хімічних властивостей полімерних селєвих носіїв лікарських препаратів на основі карбоксиметилцелюлози. *Сучасний рух науки: тези доп. VII міжнародної науково-практичної інтернет-конференції, 6-7 червня 2019 р. – Дніпро, 2019. С. 1189-1192.*
2. Mishyna M., Vekshin V., Burov A., Grabovetskaya E. Investigation of physico-chemical characteristics of carboxymethylcellulose colloidal carriers for medical preparations. *Journal of Education, Health and Sport*. 2021; №1(11). С. 202-218.

РОЗДІЛ 5

МЕТАБОЛІЧНІ ЗМІНИ В СИРОВАТЦІ КРОВІ МИШЕЙ З ІНФІКОВАНИМИ РАНАМИ

Пошкодження тканин (операційне втручання, травми, опіки, переломи кісток, опіки, відкриті рани) спричиняють в організмі потерпілого низку складних патологічних процесів, які у своїй сукупності характеризують визначений перебіг захворювання і можуть дати певні вказівки до прогнозу одужання. Серед багатьох ланок розвитку патології при ушкодженні тканин важливе місце займають показники інтенсивності процесів вільнорадикального окислення та стану імунної системи. В цьому ракурсі патогенез ранового процесу являє собою складний механізм взаємодії багатьох внутрішніх систем організму. Пошкодження шкіри супроводжується каскадом різноманітних біохімічних реакцій, які обумовлюють розвиток запального процесу, а також забезпечують компенсацію порушених функцій клітин. Однією з основних причин незадовільних перебігів відкритих ушкоджень м'яких тканин є ранова інфекція, тому вивчення показників зсувів метаболізму при розвитку запалення і нагноєння наразі все ще залишаються актуальними.

5.1. Зміни показників нітродоксидергічного обміну в сироватці крові мишей при лікуванні інфікованих ран

Як відомо, важливим показником функціонування вродженого імунітету є продукування оксиду азоту (NO), який, поряд з антимікробними пептидами, має мультимодальну дію на різні клітини-мішені та регуляторні молекули. NO представляє собою високореактивний короткоживучий вільний радикал, здатний контролювати багато функцій та біохімічних процесів як в клітинах, так і в неклітинному середовищі. Тому NO може впливати на багато ланок патогенезу при гнійних ураженнях м'яких тканин.

В організмі хребетних NO бере участь у регуляції імунітету, судинного тонусу (вазодилатації), зсіданні крові, релаксації гладеньких м'язів бронхів і шлунково-кишкового тракту, нейронних комунікацій і пам'яті, гормональних функцій, забезпечує антимікробний і протипухлинний захист.

Однак, накопичення метаболітів оксиду азоту в організмі при розвитку запалення може носити двоякий характер. З одного боку ці сполуки можуть надавати захисну антибактеріальну та антиоксидантну дію. З іншого – надмірне накопичення нітратів і нітритів може мати несприятливу дію, яка полягає в інгібуванні ряду ферментів, порушенні структури ДНК, погіршення роботи судин, зниженні загального кров'яного тиску, погіршенні стану системи згортання крові. За деяких обставин підвищена продукція вільного NO як наслідок імунних реакцій при запаленні або інфекції може мати шкідливі наслідки. Важкий сепсис, пневмонія або інша важка інфекція викликають дуже сильне підвищення утворення оксиду азоту, що призводить до розвитку бактеріально-токсичного шоку з можливим розвитком поліорганної недостатності. В свою чергу, надмірне підвищення продукції NO пошкоджує не тільки патогенні мікроорганізми, а й клітини організму господаря, що може призводити до надмірної інтенсивності запалення або до надмірного розширення зони некрозу при гнійних процесах.

Оскільки NO є одним з ключових ланок у патофізіології окисного стресу до складу завдань даного дослідження входило вивчення показників нітросидергічного обміну – сумарних метаболітів NO, нітратів і нітритів – в сироватці крові мишей при лікуванні інфікованих ран.

Дані про вміст сумарних метаболітів оксиду азоту (mNO), які наведені в табл. 5.1, показали, що вже на початку спостереження (4-а доба), в період інтенсивного розвитку запалення у сироватці крові тварин всіх дослідних груп мало місце суттєве підвищення цього показника більш ніж у 2 рази ($P < 0,05$). Найвищі показники були характерні для груп контрольної патології (групи тварин з інфікованими ранами, які не підлягали лікуванню).

Таблиця 5.1

Вміст сумарних метаболітів (мкмоль/л) оксиду азоту (NO) в сироватці крові мишей ($x \pm Sx$)

Групи	Терміни дослідження (доба)					
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
	4-а n = 10	8-а n = 10	16-а n = 10	4-а n = 10	8-а n = 10	16-а n = 10
Інтактні	23,47±3,56	23,47±3,56	23,47±3,56	23,47 ± 3,56	23,47 ± 3,56	23,47±3,56
Контроль патології	56,44 ± 8,28 * P ₁ < 0,05	49,27±5,73 * P ₁ < 0,05	36,35±3,22 * P ₁ < 0,05	55,41 ± 4,45 * P ₁ < 0,05	46,41 ± 4,86 * P ₁ < 0,05	32,74±3,67 * P ₁ < 0,05
Гель зразок 4 (нізин)	45,47±7,38 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	31,28 ± 4,92 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	24,13±3,17 – ** P ₂ < 0,05	42,52 ± 6,48 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	31,46 ± 5,13 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	22,82 ± 1,84 – ** P ₂ < 0,05
Гель зразок 8 (нізин + диклофенак)	47,25 ± 5,22 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	33,52 ± 3,49 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	27,84±3,23 – ** P ₂ < 0,05	46,41 ± 5,82 * P ₁ < 0,01 ** P ₂ < 0,05	35,53 ± 3,82 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	26,54 ± 2,72 – ** P ₂ < 0,05
Мазь Левомеколь	49,46 ± 5,33 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	36,50 ± 3,54 * P ₁ < 0,02 ** P ₂ < 0,05	28,24 ± 4,28 – ** P ₂ < 0,05	47,44 ± 4,72 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	36,23 ± 4,12 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	27,4 ± 2,26 – ** P ₂ < 0,05

* P₁ – вірогідно відносно інтактної групи;

** P₂ – вірогідно відносно групи контролю патології;

В подальшому у мишей контрольних груп спостерігалось поступове зниження вмісту мNO, але і наприкінці дослідження (16-а доба) їх концентрація вірогідно перевищувала рівень у інтактних тварин.

Використання досліджуваних засобів (гель з нізином, гель з нізином і диклофенаком, мазь Левомеколь) для лікування інфікованих ран надавало вираженого ефекту на рівень мNO. І хоча ці засоби повністю не стримували процесів нітродоксидергічного обміну в період найбільшого прояву запалення (4-а доба) спостережень, але їх застосування дозволило знизити накопичення

метаболітів оксиду азоту на 8-у добу у всіх лікованих тварин. До кінця досліджу (16-а доба) вміст mNO у сироватці крові мишей, які отримували гель зразок з нізином та діклофенаком, рівень mNO повністю відповідав рівню у інтактних тварин. В інших лікованих групах вміст mNO також суттєво знижувався, але повністю не досягав рівня норми, зберігаючи тенденцію до підвищення, хоча розбіжності були невірогідними (табл.5.2).

Таблиця 5.2

Вміст нітратів (мкмоль/л) в сироватці крові мишей ($x \pm Sx$)

Групи	Терміни дослідження (доба)					
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
	4-а n = 10	8-а n = 10	16-а n = 10	4-а n = 10	8-а n = 10	16-а n = 10
Інтактні	19,80 ± 1,76	19,80 ± 1,76	19,80 ± 1,76	19,80 ± 1,76	19,80 ± 1,76	19,80 ± 1,76
Контроль патології	49,17 ± 5,28 * $P_1 < 0,05$	42,58 ± 5,23 * $P_1 < 0,05$	30,77 ± 2,82 * $P_1 < 0,05$	48,35 ± 4,56 * $P_1 < 0,05$	40,11 ± 3,85 * $P_1 < 0,05$	27,52 ± 2,73 * $P_1 < 0,05$
Гель зразок 4 (нізин)	39,02 ± 4,38 * $P_1 < 0,05$ ** $P_2 < 0,05$	25,57 ± 3,42 * $P_1 < 0,05$ ** $P_2 < 0,05$	20,55 ± 2,17 – ** $P_2 < 0,05$	36,25 ± 4,48 * $P_1 < 0,05$ ** $P_2 < 0,05$	26,09 ± 3,27 * $P_1 < 0,05$ ** $P_2 < 0,05$	19,41 ± 2,24 – ** $P_2 < 0,05$
Гель зразок 8 (нізин + діклофенак)	40,58 ± 5,22 * $P_1 < 0,05$ ** $P_2 < 0,05$	27,54 ± 2,92 * $P_1 < 0,05$ ** $P_2 < 0,05$	23,65 ± 3,23 – ** $P_2 < 0,05$	40,14 ± 4,36 * $P_1 < 0,01$ ** $P_2 < 0,05$	30,1 ± 3,18 * $P_1 < 0,05$ ** $P_2 < 0,05$	22,61 ± 3,06 – ** $P_2 < 0,05$
Мазь Левомеколь	42,70 ± 5,31 * $P_1 < 0,05$ ** $P_2 < 0,05$	30,37 ± 3,88 * $P_1 < 0,05$ ** $P_2 < 0,05$	23,85 ± 3,28 – ** $P_2 < 0,05$	40,76 ± 4,65 * $P_1 < 0,05$ ** $P_2 < 0,05$	30,12 ± 4,23 * $P_1 < 0,05$ ** $P_2 < 0,05$	23,14 ± 3,25 – ** $P_2 < 0,05$

* P_1 – вірогідно відносно інтактної групи;

** P_2 – вірогідно відносно групи контролю патології;

У дослідних тварин проводилось також вивчення концентрації в сироватці крові стабільних кінцевих метаболітів оксиду азоту – нітратів і нітритів. Дані, які наведені в табл.5.2 показали, що в цілому динаміка порушень вмісту нітратів співпадала з динамікою змін рівня mNO . Вірогідне

підвищення показників під час усього спостереження було притаманне лише групам контролю патології. У лікованих тварин підвищення даного показника навіть у період інтенсивних запальних реакцій (4-а доба) був суттєво меншим, ніж у контрольних групах. У подальшому рівень нітратів постійно зменшувався і наприкінці спостережень (16-а доба) у групах з використанням гелю зразок з нізином діклофенаком повністю нормалізувався. У групах з використанням препаратів порівняння (гель зразок з нізином і мазь Левомеколь) вміст нітратів наближався до інтактного рівня, але все ж зберігав тенденцію до підвищення.

В табл. 5.3 наведені дані про вміст нітритів у сироватці крові мишей з інфікованими ранами.

Таблиця 5.3

Вміст нітритів (мкмоль/л) в сироватці крові мишей ($x \pm Sx$)

Групи	Терміни дослідження (доба)					
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
	4-а n = 10	8-а n = 10	16-а n = 10	4-а n = 10	8-а n = 10	16-а n = 10
Інтактні	3,67 ± 0,34	3,67 ± 0,34	3,67 ± 0,34	3,67 ± 0,34	3,67 ± 0,34	3,67 ± 0,34
Контроль патології	7,27 ± 0,95 * P < 0,05	6,69 ± 0,81 * P < 0,05	5,58 ± 0,67 ** P < 0,05	7,06 ± 0,84 * P < 0,05	6,30 ± 0,64 * P < 0,05	5,22 ± 0,57 ** P < 0,05
Гель зразок 4 (нізин)	6,47 ± 0,51 * P < 0,05 **P < 0,05	5,71 ± 0,55 * P < 0,05 **P < 0,05	3,58 ± 0,46 – ** P < 0,05	6,27 ± 0,95 * P < 0,05 **P < 0,05	5,37 ± 0,55 * P < 0,05 ** P < 0,05	3,41 ± 0,27 – ** P < 0,05
Гель зразок 8 (нізин + діклофенак)	6,69 ± 0,57 * P < 0,05 ** P < 0,05	5,98 ± 0,63 * P < 0,05 **P < 0,05	4,19 ± 0,37 – ** P < 0,05	6,59 ± 0,71 * P < 0,05 ** P < 0,05	5,52 ± 0,47 * P < 0,05 ** P < 0,05	3,93 ± 0,28 – ** P < 0,05
Мазь «Левомеколь»	6,76 ± 0,81 * P < 0,05 ** P < 0,05	6,13 ± 0,67 * P < 0,05 ** P < 0,05	4,39 ± 0,57 * P < 0,05 ** P < 0,05	6,68 ± 1,21 * P < 0,05 ** P < 0,05	6,11 ± 0,58 * P < 0,05 ** P < 0,05	4,27 ± 0,44 * P < 0,05 ** P < 0,05

* P₁ – вірогідно відносно інтактної групи;

** P₂ – вірогідно відносно групи контролю патології

Як відомо, інфекція спричиняє в організмі сильну інтоксикацію, і однією з причин її розвитку є накопичення саме нітратів в клітинах організму.

З наведених даних видно, що попадання інфекції до організму через ушкодження шкіри викликало значний підйом утворення нітритів. В усіх групах тварин з інфікованими ранами рівень нітритів був підвищений щодо показників інтактної групи, що свідчило про недостатню активність метаболізму і накопичення в організмі токсичних продуктів.

І навіть незважаючи на те, що до 8-ї доби практично у всіх мишей контрольних груп візуальні ознаки запалення і інфікування ран були відсутні, показники метаболізму оксиду азоту, хоча і знижувалися в порівнянні з періодом інтенсивних запальних реакцій, все ж залишалися достовірно вище норми.

Повна нормалізація вмісту нітритів спостерігалася під кінець експерименту (16-а доба) тільки в групах тварин з використанням гелю зразку з нізином та діклофенаком.

Таким чином, виявлено, що в результаті розвитку локалізованої інфекції посилюється активність вільнорадикальних процесів в організмі, зокрема синтез оксиду азоту. Під дією медіаторів запалення відбувалося тривале підвищення синтезу оксиду азоту і його метаболітів, особливо в період інтенсивного розвитку запалення (4-а доба).

Як відомо, оксид азоту відіграє ключову роль в процесі розширення кровоносних судин [179]. Здатність судин до розширення важлива для кровопостачання пошкоджених тканин, що призводить до поліпшення постачання ураженої ділянки поживними речовинами, вітамінами і факторами росту. Крім того, NO допомагає імунній системі виконувати її важливі антибактеріальні та антивірусні функції. Однак, зменшення запалення і часткове за живлення ранового дефекту не зумовили нормалізації метаболічних процесів, і швидкість утилізації кінцевих продуктів – нітратів і нітритів – в організмі не нормалізувалася до кінця спостережень. А оскільки

високі концентрації метаболітів NO є фактором ендогенної інтоксикації, який відіграє важливу роль в розвитку інфекції, для відновлення імунологічної реактивності при гнійних ранах необхідне застосування препаратів, що призводять до значного поліпшення, а в ряді випадків до нормалізації показників системного та місцевого протиінфекційного імунітету.

В результаті проведеного дослідження виявлено позитивний вплив на процеси нітродергичного обміну гелів, які містили нізін. При чому, отримані дані показали виражений позитивний вплив локального застосування нізину, а також його комбінації з діклофенаком на нормалізації рівня оксиду азоту у сироватці крові.

5.2. Цитокіновий профіль в крові мишей при лікуванні інфікованих ран

Для боротьби з інфекцією в організмі існує багатокомпонентна імунна система, показники якої свідчать про оптимальний захист на місцевому та тканинному рівнях. Динаміка змін показників системного та місцевого протиінфекційного імунітету може дати важливу інформацію про стан організму при лікуванні гнійних ушкоджень. Гіперпродукція NO може бути обумовлена впливом медіаторів запалення, серед яких важливе місце посідають цитокіни – інтерлейкіни, інтерферони, фактори росту.

Гормоноподобні молекули паракринної, локальної дії – цитокіни є низькомолекулярними білково-пептидними факторами, які продукуються активованими імунокомпетентними клітинами і здійснюють короткодистанційну регуляцію міжклітинних взаємодій усіх ланок імунної системи через високоспецифічні рецептори на мембрані клітини-мішені, тобто вони є біорегуляторами місцевої і загальної дії, а також медіаторами міжклітинних взаємодій імунної відповіді [180].

Цитокіни опосередковано впливають на неспецифічну резистентність макроорганізму до ушкоджуючих факторів, беручи участь як у реакціях розвитку ушкодження, так в захисті від нього. Вплив цих імунокомпетентних молекул полягає не тільки в ініціації запального процесу, але і в регуляції

активності пластичного обміну, що сприяє відновленню тканин. Цитокіни виконують імунорегуляторну функцію і збільшують термін життя імунно-компетентних клітин, а також беруть участь в регуляції апоптозу. Стимулююча або інгібуюча дія цитокінів здійснюється за допомогою зв'язування їх з великою кількістю рецепторів на поверхні клітин і може бути направлено на клітини, які беруть участь в розвитку імунної відповіді, а також в запаленні і в регенерації. За своєю дією цитокіни поділяються на прозапальні та протизапальні, а їхнє співвідношення відіграє надзвичайно важливу роль в регуляції як клітинного, так і гуморального імунітету [181].

Виходячи з вищесказаного було проведено вивчення вмісту прозапального інтерлейкіна 1β (ІЛ- 1β) і протизапального інтерлейкіна 4 (ІЛ-4) у крові мишей при лікуванні інфікованих ран.

Інтерлейкін-1 (ІЛ- 1α і ІЛ- 1β) відіграє одну з центральних ролей в розвитку запальної реакції, а також у відповіді на бактеріальну інфекцію або пошкодження тканин. ІЛ-1 бере участь у регуляції температури тіла, його підвищена продукція призводить до розвитку лихоманки. Сильне підвищення рівня ІЛ-1 призводить до артеріальної гіпотонії, анорексії. Підвищення рівня ІЛ-1 спостерігається при септичному шоці, запальному ураженні кишечника, цукровому діабеті II типу. Цей ІЛ є ініціатором запуску цитокінового каскаду в тканинах, підсилюючи тим самим як власну продукцію, так і синтез ІЛ-6, ІЛ-8 і ФНП.

Інтерлейкін-4 (ІЛ-4) є протизапальним цитокіном, який посилює проліферації В-лімфоцитів і Т-лімфоцитів, стимулює протизапальні ефекти. Він контролює численні молекулярні процеси, які викликають дезактивацію запальних макрофагів, а також придушення секреції прозапальних цитокінів $\text{TNF-}\alpha$, ІЛ-1 і ІЛ-8. ІЛ-4 є ключовим регулятором гуморального і адаптивного імунітету.

Як показали отримані дані (табл. 5.4) при утворенні інфікованих ран в сироватці крові мишей в період активного формування запалення (4-а доба) відзначалося суттєве підвищення вмісту прозапального ІЛ- 1β . В групах

мишей з контрольною патологією рівень ІЛ-1 β зростав у 4,7 рази відносно інтактного рівня. Ріст цього показника в групах мишей, які отримували місцеве лікування, був більш стриманим і складав 2,6 – 3,3 рази, що було вірогідно менше, ніж в контрольних групах.

Подальше загоювання ран (8 – 16-а доба) зменшувало інтенсивність утворення ІЛ-1 β , але значення показника зоставалося вірогідно вищим за рівень у інтактних тварин в усі терміни спостереження (табл.5.4).

Таблиця 5.4

Вміст ІЛ-1 β (пг/мл) в сироватці крові мишей ($x \pm Sx$)

Групи	Терміни дослідження (доба)					
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
	4-а n = 10	8-а n = 10	16-а n = 10	4-а n = 10	8-а n = 10	16-а n = 10
Інтактні	33,28 \pm 2,65	33,28 \pm 2,65	33,28 \pm 2,65	33,28 \pm 2,65	33,28 \pm 2,65	33,28 \pm 2,65
Контроль патології	158,50 \pm 20,25 * P ₁ <0,05	125,33 \pm 15,74 * P ₁ < 0,05	66,32 \pm 10,48 * P ₁ < 0,05	137,44 \pm 17,52 * P ₁ < 0,05	116,67 \pm 14,83 * P ₁ <0,05	63,75 \pm 9,67 * P ₁ <0,05
Гель зразок 4 (нізин)	85,74 \pm 9,63 * P ₁ < 0,05 **P ₂ < 0,05	54,06 \pm 6,41 * P ₁ < 0,02 ** P ₂ < 0,05	34,35 \pm 3,22 – ** P ₂ < 0,05	82,55 \pm 8,48 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	51,62 \pm 5,73 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	32,64 \pm 2,84 – ** P ₂ < 0,05
Гель зразок 8 (нізин + диклофенак)	97,45 \pm 10,33 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	61,75 \pm 8,23 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	38,46 \pm 4,39 – ** P ₂ < 0,05	94,61 \pm 11,35 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	58,31 \pm 6,29 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	36,15 \pm 3,76 – **P ₂ < 0,05
Мазь Левомеколь	109,43 \pm 10,33 * P ₁ < 0,05 **P ₂ < 0,05	77,55 \pm 9,39 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	48,24 \pm 4,28 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	102,31 \pm 12,74 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	73,45 \pm 8,26 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	46,15 \pm 5,28 * P ₁ < 0,05 **P ₂ < 0,05

* P₁ – вірогідно відносно інтактної групи;

** P₂ – вірогідно відносно групи контролю патології

Проведене місцеве лікування із застосуванням гелів зразку 4 і 8, а також мазі Левомеколь спричиняло позитивний ефект на стан загального імунітету: рівень ІЛ-1 β у мишей усіх лікованих груп поступово зменшувався, але тільки

в групах с використанням геля з нізином наприкінці експерименту (16-а доба) спостерігалось повне відновлення вмісту даного цитокину. В групі із застосуванням гелю нізином + диклофенак рівень ІЛ-1 β зберігав тенденцію до підвищення, хоча значення показників були вірогідно нижчими за показники в групах контролю патології. В групі з використанням мазі Левомеколь (препарат порівняння) рівень даного цитокину також поступово знижувався, але в останні терміни спостереження (16-а доба) значення показника, хоча і були суттєво нижчі, ніж в групах контролю, але все ж таки вірогідно перевищували рівень інтактних тварин. Картина динаміки показників протизапального ІЛ-4 була іншою (табл.5.5).

Таблиця 5.5

Вміст ІЛ-4 (пг/мл) в сироватці крові мишей ($x \pm Sx$)

Групи	Терміни дослідження (доба)					
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
	4-а n = 10	8-а n = 10	16-а n = 10	4-а n = 10	8-а n = 10	16-а n = 10
Інтактні	3,27 \pm 0,5	3,27 \pm 0,5	3,27 \pm 0,5	3,27 \pm 0,5	3,27 \pm 0,5	3,27 \pm 0,5
Контроль патології	4,47 \pm 0,28 *P ₁ < 0,05	5,47 \pm 0,72 * P ₁ < 0,00	6,36 \pm 0,74 * P ₁ < 0,02	4,18 \pm 0,46 * P ₁ < 0,05	5,21 \pm 0,6 3 * P ₁ < 0,05	6,04 \pm 0,67 * P ₁ < 0,05
Гель зразок 4 (нізин)	6,75 \pm 0,84 *P ₁ < 0,05 **P ₂ < 0,05	7,52 \pm 0,65 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	8,44 \pm 0,77 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	6,25 \pm 0,68 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	7,16 \pm 0,85 * P ₁ < 0,05 **P ₂ < 0,05	8,28 \pm 0,83 * P ₁ < 0,05 **P ₂ < 0,05
Гель зразок 8 (нізин + диклофенак)	5,45 \pm 0,52 * P ₁ < 0,05 **P ₂ < 0,05	6,28 \pm 0,49 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	7,44 \pm 0,83 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	5,64 \pm 0,68 * P ₁ < 0,01 ** P ₂ < 0,05	5,93 \pm 0,38 * P ₁ < 0,05 **P ₂ < 0,05	7,84 \pm 0,72 * P ₁ < 0,05 **P ₂ < 0,05
Мазь Левомеколь	5,16 \pm 0,33 *P ₁ < 0,05 **P ₂ < 0,05	5,82 \pm 0,49 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	7,24 \pm 0,42 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	5,44 \pm 0,62 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05	5,83 \pm 0,52 * P ₁ < 0,05 **P ₂ < 0,05	7,41 \pm 0, 46 * P ₁ < 0,05 ** P ₂ < 0,05

* P₁ – вірогідно відносно інтактної групи;

** P₂ – вірогідно відносно групи контролю патології

Як видно з наведених даних базовий рівень цього цитокіну був набагато нижчий за ІЛ-1 β . І навіть після утворення гнійних ран (4-а доба) інтенсивність синтезу протизапального цитокіну була в середньому лише на 36% вища за інтактний рівень ($P < 0,05$). В подальшому рівень ІЛ-4 в групах мишей з контрольною патологією поступово зростав і на 16-у добу був вже майже в 2 рази вищий за інтактний рівень.

При застосуванні місцевого лікування підвищення показника було більш суттєвим. Вже на 4-у добу рівень ІЛ-4 в групах лікованих тварин був вірогідно вищим не тільки за показники в інтактній групі, а й у 1,5 – 2 рази перевищував рівень в групах контролю патології. Найбільш значними були показники в групі з місцевим застосуванням гелю зразок з нізином та діклофенаком.

Аналізуючи отримані дані можна сказати, що розвиток запального процесу при утворенні інфікованих ран супроводжувався суттєвими змінами стану імунних механізмів захисту організму. Це проявлялися в змінах вмісту в сироватці крові цитокінів різноспрямованої дії: синтез прозапального ІЛ-1 β з перших днів утворення інфікованої рани був суттєво підвищений, що свідчило про інтенсивний перебіг гнійно-некротичного процесу; а вміст протизапального ІЛ-4 зростав поволі через підвищену активність прозапальних чинників. Імовірно це відбувалося через місцеві зміни складу клітин крові в осередку запалення, в тому числі кількісного співвідношення популяцій і субпопуляцій лімфоцитів, розбалансування нейро-гуморальної регуляції, а також за рахунок посилення загальної імунної відповіді організму на пошкодження шкіри і бактеріальну агресію.

Такі зміни динаміки різних медіаторів варіювали в залежності від періоду формування ранового дефекту, оскільки відображали процеси місцевого запалення і активацію імунних механізмів захисту. Переважання в складі клітин, які мігрували в осередок, поліморфоядерних і мононуклеарних лейкоцитів і підвищена активність фагоцитів індукувало ріст вмісту прозапальних цитокінів, перш за все ІЛ-1 β , яке ми спостерігали в нашому

дослідженні. Ріст при утворенні інфікованих ран концентрації в сироватці крові ІЛ-1 β вказував на надмірне напруження в підтримці клітинного і гуморального імунної відповіді. У той же час повільний ріст рівню ІЛ-4 свідчив про наявну недостатність місцевих механізмів імунітету. Це узгоджується з даними літератури про регуляторну дію ІЛ-1 β на ранніх етапах загоювання рани на синтез других цитокінів та ростових факторів.

Застосування гелів зразку з нізином та суміші низин + диклофенак, а також мазі Левомеколь для проведення місцевого лікування пошкоджень шкіри спричиняло позитивний ефект на стан загального імунітету: рівень ІЛ-1 β у мишей усіх лікованих груп поступово зменшувався, а рівень ІЛ-4 в групах лікованих тварин був вірогідно вищим не тільки за показники в інтактній групі, а й перевищував рівень в групах контролю патології. Найбільш значними були показники в групі з місцевим застосуванням гелю зразок нізин + диклофенак.

Висновки до розділу 5:

1. Утворення інфікованих ран вже на 4-у добу дослідження викликало істотне підвищення рівня метаболітів оксиду азоту (NO) в сироватці крові, що свідчило про розвиток в організмі оксидативного стресу та ендогенної інтоксикації.

2. Такий стан вільно радикальних порушень супроводжувався суттєвими змінами стану імунних механізмів захисту організму, що проявлялися в змінах вмісту в сироватці крові цитокінів різноспрямованої дії: синтез прозапального ІЛ-1 β з перших днів утворення інфікованої рани був суттєво підвищений, що свідчило про інтенсивний перебіг гнійно-некротичного процесу; а вміст протизапального ІЛ-4 зростав поволі через підвищену активність прозапальних чинників.

3. Застосування гелів зразку з нізином та суміші низин + диклофенак, а також мазі Левомеколь для проведення місцевого лікування інфікованих ран справляло позитивний ефект на нітросидергичний обмін і стан загального

імунітету. Найбільш оптимальними були показники в групі з місцевим застосуванням гелю зразок 4 (нізин).

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

4. Burov Andriy, Vekshyn Vitaliy, Grabovetskaya Evgeniya. Application Of Carboxymethylcellulose As A Carrier Of Medical Preparations For The Burn Wounds Treatment Міжнародна конференція «International Scientific Interdisciplinary Conference (ISIC) Kharkov, 18 - 20 September, 2019.

РОЗДІЛ 6

ВИЗНАЧЕННЯ МОРФОЛОГІЧНИХ ЗМІН ТКАНИН ОСЕРЕДКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО УРАЖЕННЯ ЗА ДІЇ ПРОТИМІКРОБНОГО ПРЕПАРАТУ З НІЗИНОМ

Матеріалом для морфологічного дослідження послужили тканини (шкіра, підшкірна клітковина, м'язи), висічені із стегна мишей всіх досліджуваних груп в зоні внутрішньошкірного введення бактеріальної суспензії на 16 добу експерименту. Матеріал фіксували в 10% нейтральному формаліні, після чого висікали шматочки товщиною близько 0,004 м. Матеріал піддавали спиртовій проводці і парафіновій заливці, виготовляли зрізи товщиною 5-6 мкм. Оглядові препарати, забарвлені гематоксиліном і еозином, використовувалися для загальної оцінки стану досліджуваних тканин. Фарбування препаратів фукселіном на еластичні волокна по Вейгерту з дофарбуванням піккрофусіном за ван Гізеном використовувалося для виявлення і диференціювання сполучнотканинних структур. Для оцінки функціональної активності тканин використовували комплекс гістохімічних методик. Дезоксинуклеопротейди (ДНП) виявляли реакцією по Фельгену-Россенбеку (контроль - гідроліз з HCl). Рібонуклеопротейди (РНП) виявляли забарвленням по методу Браше (контроль кристалічною рібонуклеазою). За допомогою PAS-реакції по Мак Манусу Хочкісу (контроль з амілазою) виявляли нейтральні глікозаміноглікани (ГАГ). Гістологічні та гістохімічні методики виконувалися за прописами, викладеним в інструкціях по гістологічній техніці і гістохімії [182, 183].

Вивчення препаратів, забарвлених гістологічними і гістохімічними методами проводилося на мікроскопі Olympus BX-41 з використанням програм Olympus DP-Soft (Version 3: 1).

6.1. Морфологічні дослідження шкіри мишей, інфікованих *Pseudomonas aeruginosa*, з наступною терапією маззю «Левомеколь».

Мікроскопічно у всіх спостереженнях в зоні внутрішкірного введення *pseudomonas aeruginosa* візуалізується рановий дефект, виповнений грануляційною тканиною та вкритий струпом, сформованим з уривків некротизованого епідермісу, фібрину, гемолізованих еритроцитів та ПЯЛ. Між струпом та грануляційною тканиною у центральній зоні розташований тонкий лейкоцитарно-фібринозний шар. Верхній шар зони регенерату представлений рівномірно розташованими вертикально орієнтованими тонкостінними повнокровними судинами приблизно однакового діаметра. Ендотелій судин соковитий з округлим базофільним ядром і слабо базофільною цитоплазмою. Судинна базальна мембрана тонка, бесперервна, PAS-позитивна. Судини оточені численними фібробластами з помірно базофільним округлим ядром і слабо базофільною цитоплазмою, розташованими без певної орієнтації численними тонкими помірно фуксинофільних колагеновими волокнами, незрілими клітинами гематогенного ряду, макрофагами і одиничними ПЯЛ. Гістохімічно в ендотелії судин та у фібробластах виявляється інтенсивна реакція на РНП у цитоплазмі та на ДНП у ядрі, що свідчить про виражену синтетичну та проліферативну активність цих клітин. У нижньому шарі зони регенерату переважають горизонтально орієнтовані фібробласти, фіброцити і тонкі пучки колагенових волокон; зміст останніх наростає у напрямку до периферичних відділів. У порівнянні з верхнім шаром регенерату зменшується кількість судин, вони більш диференційовані, різного діаметру, розташовані нерівномірно, мають приблизно однаковий діаметр, частина судин виглядає спустошеною з облітерацією їх просвіту. У ендотеліоцитах судин та фібробластах зменшується інтенсивність реакцій на ДНП та РНП. В деяких судин відмічається потовщення базальної мембрани. Придатки шкіри в зоні регенерату не визначаються (рис. 6.1).

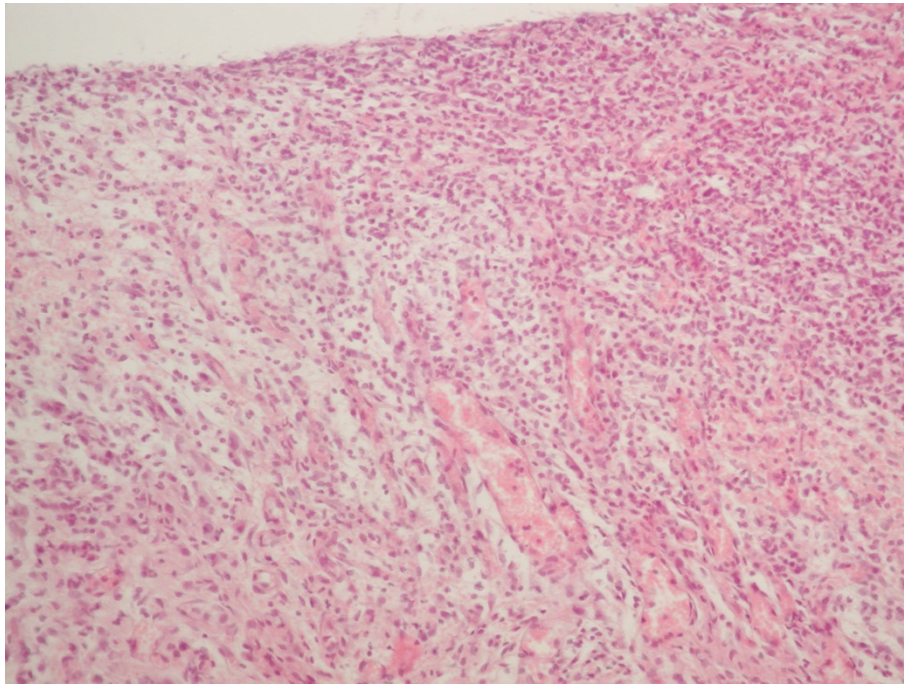


Рис.6.1 Зона регенерату, вкрита лейкоцитарно-некротичним шаром. інфіковані миші *pseudomonas aeruginosa*, терапія з використанням мазі левомеколь. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 200$.

Периферичні відділи зони регенерату покриті новоствореним епідермісом, який вростає під струп у вигляді пальцевидних потовщень. Епідерміс нерівномірно потовщений за рахунок гіперплазії і гіпертрофії клітин шипуватого шару, кількість рядів яких досягає 4-6; клітини великі зі світлою цитоплазмою і округлим ядром. У частині епідермоцитів шипуватого шару ядра пікнотичним, в цитоплазмі містяться оптично порожні вакуолі. В базальному шарі клітини менших розмірів з циліндричним базофільним ядром, зустрічаються фігури мітозу. Роговий шар з явищами осередкового гіпер- і паракератозу. Базальна мембрана епідермісу PAS-позитивна, безперервна, декілька потовщена у краях епідермального пласта.

У 50% спостережень в прилеглих до зони регенерату тканинах (переважно у підшкірно-жировій клітковині) виявляються осередкові лейкоцитарні інфільтрати, у деяких судинах – ознаки продуктивного васкуліту з проліферацією ендотеліоцитів, гладко-м'язових клітин та

дрібноосередковими лімфоїдними інфільтатами навколо таких судин. Зустрічаються поодинокі вторинні дрібноосередкові стромальні та жирові некрози. Поза описаних змін в цих спостереженнях та в інших 50% випадків тканини, що прилегають до зони регенерату, зберігають звичайну гістологічну будову.

Резюме.

При лікуванні маззю левомеколь мишей з раною шкіри, інфікованою *pseudomonas aeruginosa*, мікроскопічно до 14-ї доби експерименту явища травматичного запалення йдуть на другий план і переважають ознаки другої фази процесу загоєння: сформована двошарова зона регенерату, епідермізація у порівнянні з групою без лікування носить більш розповсюджений характер. Разом з тим, в 50% спостережень у тканинах, що оточують зону регенерату, зберігаються нерізко виражені запально-деструктивні явища у вигляді продуктивного васкуліту, осередкової запальної інфільтрацій та формуванням вторинних дрібноосередкованих стромальних та стеатонекрозів.

Таким чином, отримані дані дозволяють визначити морфологічні особливості перебігу ранового процесу у мишей з раною шкіри, інфікованою *pseudomonas aeruginosa*, при лікуванні маззю левомеколь.

6.2. Морфологічні дослідження шкіри мишей, інфікованих *Staphylococcus aureus*, з наступним лікуванням маззю «Левомеколь».

При мікроскопічному дослідженні у препаратах всіх спостережень у зоні попереднього внутрішньошкірного введення мікроорганізмів візулізується рановий дефект у межах шкіри та підшкірної клітковини, виповнений дозріваючою грануляційною тканиною (зона регенерата) з епідермізацією її периферичних відділів. Епідермальний пласт потовщений за рахунок гіпертрофії та гіперплазії клітин шипуватого шару, яких налічує 3-5 рядів. У 40% спостережень у шипуватому шарі у групах клітин

зустрічаються дистрофічні зміни у вигляді вакуольної дистрофії, у роговому шарі виявляються локуси гіперкератозу та паракератозу. У базальному шарі видно багаточисельні мітози, гіперхромія ядер. При реакції Фельгена-Росенбека найбільша вираженість відмічається у ядрах клітин базального шару, у дистрофічно змінених клітинах вона різко знижена. Реакція Браше добре виражена в епідермоцітах шипуватого шару, але знижена у клітинах в стані вакуольної дистрофії. При PAS-реакції базальна мембрана епідермісу бесперервна, нерівномірно потовщена.

У всіх спостереженнях сформований струп, що підноситься над поверхнею шкіри, під який востає новостворений епідермальний пласт. У складі струпа визначаються некротизовані тканини шкіри, гемолізовані еритроцити, склеєні фібрином. Під струпом визначається тонкий лейкоцитарно-фібринозний шар, нижче – зона регенерату.

Верхній шар грануляційної тканини, що виповнює рановий дефект, багатий рівномірно розташованими вертикальними судинами капілярного типу в більшості спостережень приблизного одного діаметра. Судини повнокровні, виступаючі в просвіт судин набряклі ендотеліоцити мають округле базофільне ядро з помірною реакцією на ДНП і слабо базофільну цитоплазмою з інтенсивною реакцією на РНП. Судинна базальна мембрана тонка, PAS-позитивна. Між судинами визначаються хаотично розташовані ніжні помірно фуксинофільні колагенові волокна, що складаються в тонкі пучки, численні фібробласти, макрофаги, і поодинокі поліморфноядерні лейкоцити. У фібробластах інтенсивність реакції на ДНП в ядрі та на РНП в цитоплазмі добре виражена (рис. 6.2).

У нижньому шарі зони регенерату переважають колагенові волокна, що формують різної товщини фуксинофільні пучки, орієнтовані паралельно поверхні шкіри, вміст клітин і судин зменшується. Помірно кровонаповнені судини більш диференційовані, різного діаметру, нерівномірно розташовані, вистелені сплющеної форми ендотеліоцитами з помірно вираженою реакцією на РНП та ДНП. Базальна мембрана судин потовщена, PAS-позитивна. Деякі

судини з ознаками спустошення.

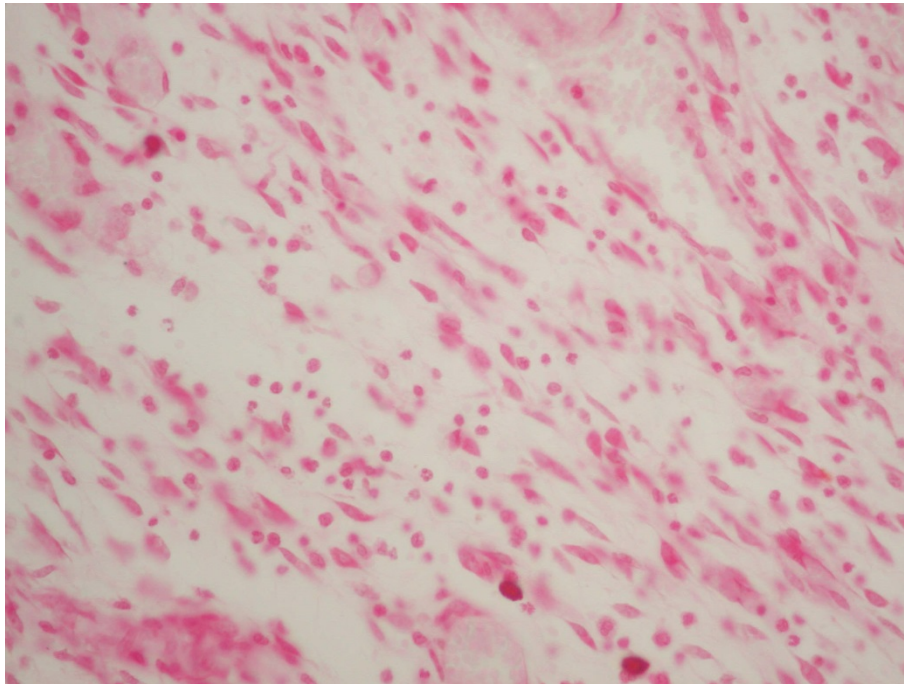


Рис. 6.2 Інтенсивна реакція на РНП у цитоплазмі фібробластів та ендотеліальних клітин. інфіковані миші *staphylococcus aureus*, терапія з використанням мазі левомеколь. Реакція Браше, $\times 400$.

Придатки шкіри в зоні регенерату не визначаються. Прилеглі до регенерату тканини, як правило, звичайної гістологічної будови, проте в 4-х спостереженнях в окремих судинах спостерігаються явища проліферативного васкуліту, зустрічаються осередкові лейкоцитарні інфільтрати жирової тканини, дрібносередкові вторинні стромальні та жирові некрози.

Резюме.

Наприкінці терміну експерименту у мікропрепаратах шкіри, що вивчалися, превалюють морфологічні ознаки другої фази ранового процесу – сформований двошаровий пласт грануляційної тканини, триває епідермізація зони регенерату. Однак в 40% випадків в прилеглих до регенерату тканинах виявляються ознаки проліферативного васкуліту, дрібносередкові жирові та стромальні некрози, дрібні лейкоцитарні інфільтрати, що може сприяти

гальмуванню репаративного процесу.

Таким чином, дані мікроскопічного дослідження препаратів шкіри мишей з раною шкіри, інфікованою *staphylococcus aureus*, з лікуванням маззю Левомеколь дозволяють визначити морфологічні особливості перебігу ранового процесу.

6.3. Морфологічні дослідження шкіри мишей, інфікованих *Pseudomonas aeruginosa*, терапія з використанням експериментального гелю з нізином.

При мікроскопічному дослідженні препаратів шкіри вивченої групи в зоні введення *pseudomonas aeruginosa* на закінчення експерименту спостерігається утворення ранового дефекту шкіри та підшкірно-жирової клітковини, що виповнена грануляційною тканиною, по поверхні вкрита струпом. Під струпом, що складається з уривків некротизованого епідермісу, фібрину та гемолізованих еритроцитів, в центральному відділі візуалізується тонкий лейкоцитарно-фібринозний шар, по периферії під струп врастає епідерміс.

Зона регенерату двошарова. Верхній шар містить велику кількість недиференційованих повнокровних судин, переважно вертикально орієнтованих. Ендотелій, що вистилає судини, набряклий має велике базофільне ядром і світлу цитоплазму. Гістохімічно у ядрах визначається інтенсивна реакція Фельгена-Росенбека, у цитоплазмі – інтенсивна реакція Браше. При PAS-реакції судинна базальна мембрана візуалізується у вигляді тонкої безперервної лінії. Між судинами визначаються тонкі помірно фуксинофільні колагенові волокна без певної орієнтації, тяжі фіброblastів з інтенсивною реакцією на ДНП у ядрі та на РНП у цитоплазмі, а також множинні клітинні елементи. У двох випадках (20%) у складі клітин визначаються дрібноосередкові скупчення ПЯЛ, переважно еозинофільних лейкоцитів (рис. 6.3).

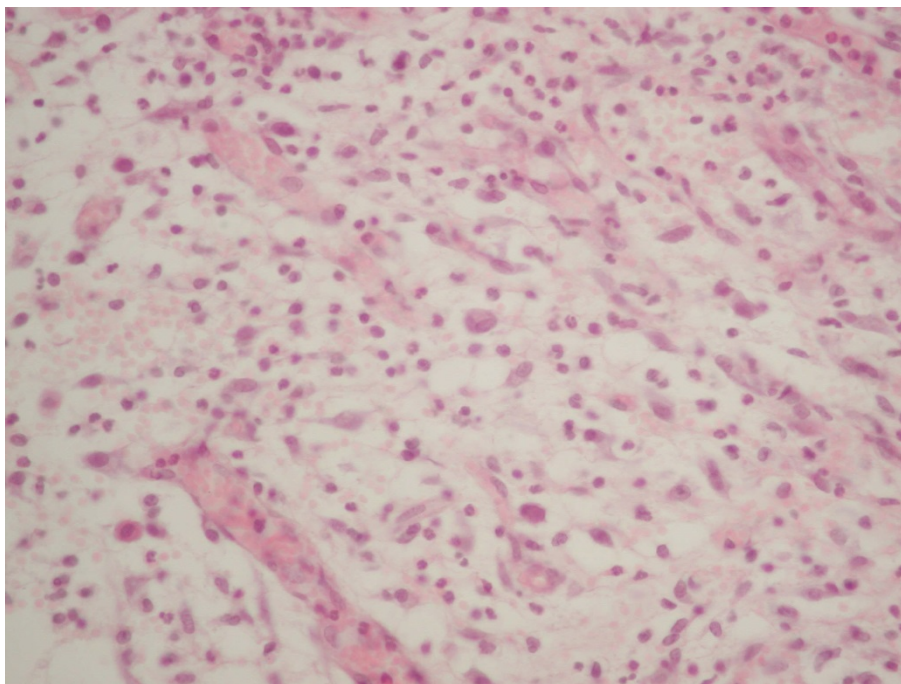


Рис. 6.3. У верхньому шарі зони регенерату повнокровні судини капілярного типу, дрібні периваскулярні скупчення ПЯЛ. Інфіковані миші *pseudomonas aeruginosa*, терапія з використанням експериментального гелю з нізином. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$.

Нижній шар зони регенерату складають переважно фуксинофільні колагенові волокна, які складаються у різної товщини пучки, останні лежать паралельно поверхні шкіри. Між ними візуалізуються судини і фібробласти, вміст яких у порівнянні з верхнім шаром знижується. Визначаються небагаточисленні фіброцити. Інтенсивність реакцій на ДНП в ядрі та на РНП в цитоплазмі фібробластах знижується, у фіброцитах визначається слабо. Судини в грануляційній тканині нижнього шару більш диференційовані, вони розташовані нерівномірно и мають різний діаметр. Окремі суди з ознаками спорожніння. Судинна базальна мембрана при PAS-реакції виглядає потовщеною, декілька рихлою. Ендотеліоцити витягнутої форми, з помірною реакцією Браше в цитоплазмі та Фельгена-Росенбека у ядрі. Придатки шкіри в зоні регенерату не візуалізуються.

Епідерміс у краях епідермізації, де він вростає під струп, нерівномірно

потовщений за рахунок гіпертрофії і гіперплазії клітин шипуватого шару до 4-6 рядів. Клітини базального шару з гіперхромними ядрами, численими фігурами мітозу та слабо базофільною цитоплазмою. Шипуваті епідермоцити великих розмірів, мають світлу цитоплазму, базофільне ядро. В деяких клітинах або їх групах відмічаються ознаки вакуольної дистрофії. Реакція на ДНП інтенсивна в ядрах клітин базального шару, помірна в ядрах шипуватого шару, та низька у клітинах, що знаходяться в стані дистрофії. Аналогічні зміни визначаються в цитоплазмі при реакції на РНП. Роговий шар кілька з осередковим гіперкератозу та паракератозу.

У 40% спостережень у оточуючих зону регенерату тканинах осередково спостерігаються у судинах ознаки проліферації ендотелію періваскулярними лімфоїдно-клітинними інфільтратами, зустрічаються дрібні фокуси вторинних стромальних та жирових некрозів, в жировій тканині мають місце дрібноосередкові лейкоцитарні інфільтрати, з них у двох випадках у складі інфільтратів значна кількість еозинофільних лейкоцитів, в клітинах придатків шкіри - дистрофічні зміни. В інших 60% спостережень тканини звичайної гістологічної будови.

Резюме.

При моделюванні інфікованого *pseudomonas aeruginosa* ранового процесу та лікуванні низіном по завершенні експерименту превалює друга фаза загоєння, що морфологічно підтверджується формуванням двошарової зони регенерату та епідермізацією її периферичних відділів. Разом з тим у 40% випадків тканинах, що оточують зону регенерату, подекуди спостерігаються явища продуктивного васкуліту з розвитком вторинних стромальних та жирових некрозів, зустрічаються дрібноосередкові лейкоцитарні інфільтрати жирової тканини, з них у 20% випадків у складі клітинних інфільтратів переважають еозинофільні лейкоцити, що також спостерігаються в зоні регенерату. У новоствореному епідермісі виявляються слабо виражені дистрофічні зміни.

Таким чином, дані, що отримані під час морфологічного дослідження,

дозволяють визначити на експериментальному матеріалі особливості перебігу загоєння рани, що інфікувані *pseudomonas aeruginosa* та лікуванні експериментальним гелем з нізином.

6.4. Морфологічні дослідження шкіри мишей, інфікованих *Staphylococcus aureus*, терапія з використанням експериментального гелю з нізином та диклофенаком натрію.

Наприкінці експерименту у 60% випадків зона регенерату повністю епідермізована, в інших випадках периферичні відділи зони регенерату на значному протязі покриті рівномірно потовщеним епідермісом з ознаками гіпертрофії і гіперплазії епідермоцитів шипуватий шару, кількість рядів їх становить від 3 до 5 (рис. 6.4). У 3-х спостереженнях в новоствореному епідермісі візуалізується вакуольна дистрофія окремих клітин шипуватий шару з різким зниженням в них інтенсивності реакцій на ДНП та РНП; зустрічаються невеликі ділянки гіпер- і паракератозу. Базальна мембрана епідермісу PAS-позитивна, безперервна, тонка, декілька потовщена в локусах гіперплазії.

У верхньому шарі зони регенерату переважають вертикально орієнтовані тонкостінні судини приблизного одного діаметра, з рівномірним їх розподілом. Судини помірно кровонаповненні, вистелені виступаючими в просвіт набряклими ендотеліоцитами з круглястим базофільним ядром і слабо базофільною цитоплазмою. У ядрах визначається інтенсивна реакція на ДНП, у цитоплазмі – інтенсивна реакція на РНП. Базальна мембрана судин тонка, гомогенна, PAS-позитивна. Навколо судин визначаються численні клітинні елементи (тяжі фібробластів, макрофаги, лімфоцити, поодинокі ПЯЛ), тонкі пучки фуксинофільних колагенових волокон, які не мають певної орієнтації. Реакція Фельгена-Росенбека у ядрах фібробластів носить інтенсивний характер, реакція Браше у цитоплазмі добре виражена.

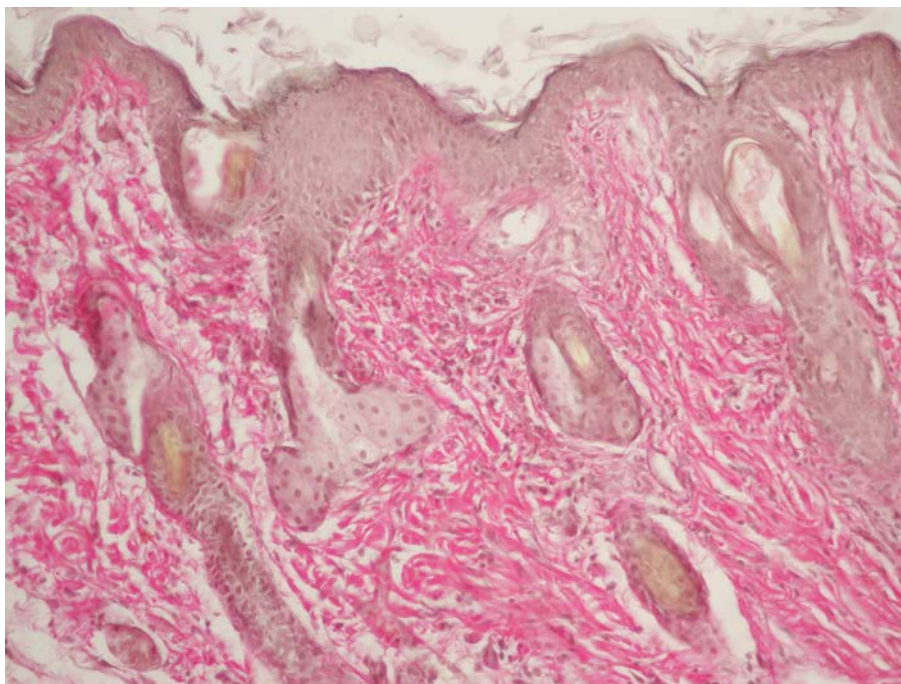


Рис. 6.4. Повна епідермізація зони регенерату. Осередкова гіперплазія епідермісу. Інфіковані миші *staphylococcus aureus*, терапія з використанням експериментального гелю з нізином та диклофенаком натрію. Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 400$.

У нижньому шарі зони регенерату превалюють фуксинофільні пучки колагенових волокон, що лежать паралельно поверхні шкіри, кількість клітин і судин зменшується. Судини з ознаками диференціювання їх стінки на шари, частина з явищами спустошення. Ендотеліоцити, що вистилають судини сплющеної форми, мають витягнуту форму, реакція на ДНП в ядрах виражена помірно, реакція на РНП у цитоплазмі теж виражена помірно. Судинна базальна мембрана при PAS-реакції добре контурується, бесперервна. Придатки шкіри в зоні регенерату визначаються не завжди.

Будову прилеглих до регенерату тканин, в більшості спостережень не змінено у порівнянні з контрольною групою, однак в 1-му випадку (10%) в поверхневих відділах дерми зустрічаються дрібні осередки некрозу стромы, у підшкірно-жировій клітковині визначаються дрібноосередкові скупчення ПЯЛ і дрібні жирові некрози.

Резюме

Дані мікроскопічного дослідження препаратів шкіри мишей з інфікованою *staphylococcus aureus* раною і лікуванням експериментальним гелем з нізином та диклофенаком натрію свідчать про те, що наприкінці сформуваній двошаровий регенерат і здійснюється процес його епідермізації, проте в 10% випадків в прилеглих до зони регенерату тканинах зустрічаються дрібні осередки вторинних стромальних та жирових некрозів, у 30% спостережень у новоствореному епідермісі виявляються дистрофічні зміни окремих клітин. Знайдені зміни на наш погляд суттєво не впливають на темпи процесу репарації.

Таким чином, дані мікроскопічного дослідження препаратів шкіри мишей з інфікованою *staphylococcus aureus* раною, що лікувалися експериментальним гелем з нізином та диклофенаком натрію дають можливість оцінити морфологічні особливості перебігу репаративного процесу в досліджуваній групі.

6.5. Морфологічні дослідження шкіри мишей, інфікованих *Staphylococcus aureus*, терапія з використанням експериментального гелю з нізином.

Мікроскопічно в препаратах шкіри в області попереднього введення внутрішньошкірно *Staphylococcus aureus* з некротизованих тканин, фібрину сформований струп під яким визначається тонкий лейкоцитарно-фібринозний шар, нижче - зона регенерату, яка складається з двох шарів.

Верхній шар зони регенерату багатий рівномірно розташованими тонкостінними судинами з численними еритроцитами в просвіті. Ендотеліоцити з базофільним великим ядром і світлою цитоплазмою виступають в просвіт. В ядрах відмічається інтенсивна реакція на ДНП, у цитоплазмі – на РНП. Судинна базальна мембрана тонка безперервна, PAS-позитивна. Навколо судин розташовані численні фібробласти у вигляді тяжів,

визначаються тонкі помірно фуксинофільні колагенові волокна, які не мають певної орієнтації, виявляються клітини гематогенного ряду і макрофаги. Гістохімічно фібробласти характеризуються активними синтетичними та проліферативними властивостями.

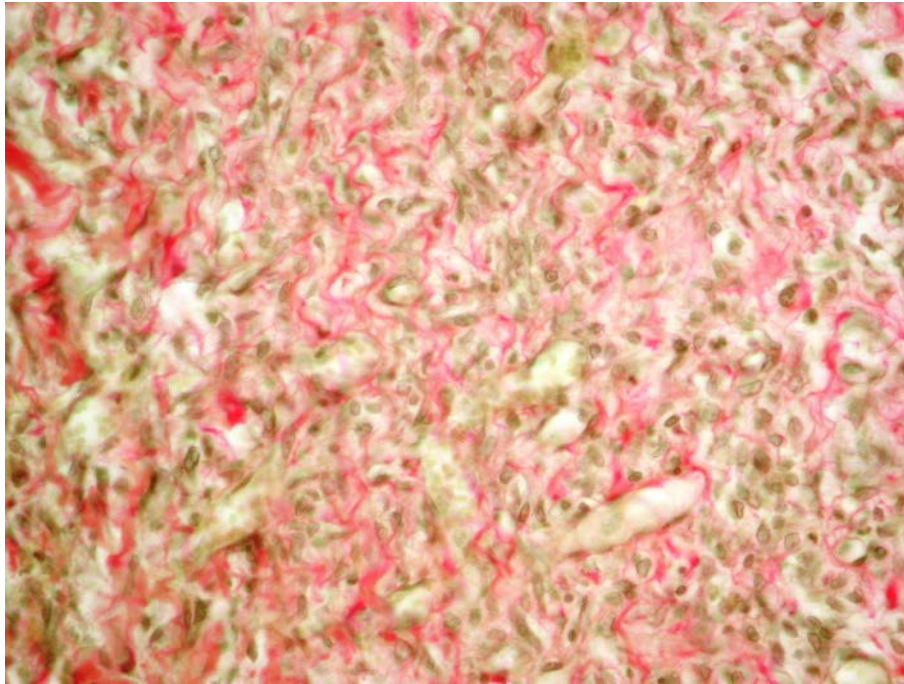


Рис. 6.5. Верхній шар зони регенерату. Інфіковані миші *staphylococcus aureus*, терапія з використанням експериментального гелю з нізином. Забарвлення за ван Гізоном. $\times 400$.

У нижньому шарі переважають колагенові волокна, які формують різної товщини фуксинофільні пучки, розташовані паралельно поверхні шкіри, вміст судин і фібробластів знижується, з'являються фіброцити з базофільним витягнутим ядром. У фібробластах відмічається зниження реакції на ДНП в ядрі та на РНП в цитоплазмі (рис. 6.6). Судини нерівномірно розташовані, різного діаметру, з диференціюванням стінки на шари, частина з них зі звуженим просвітом та облітерацією колагеновими волокнами. Судинна базальна мембрана потовщена, безперервна, помірно PAS-позитивна. Ендотеліоцити сплюснені, з помірною реакцією Браше в цитоплазмі та Фельгена-Росенбека у ядрі. Придатки шкіри в зоні регенерату

не візуалізується.

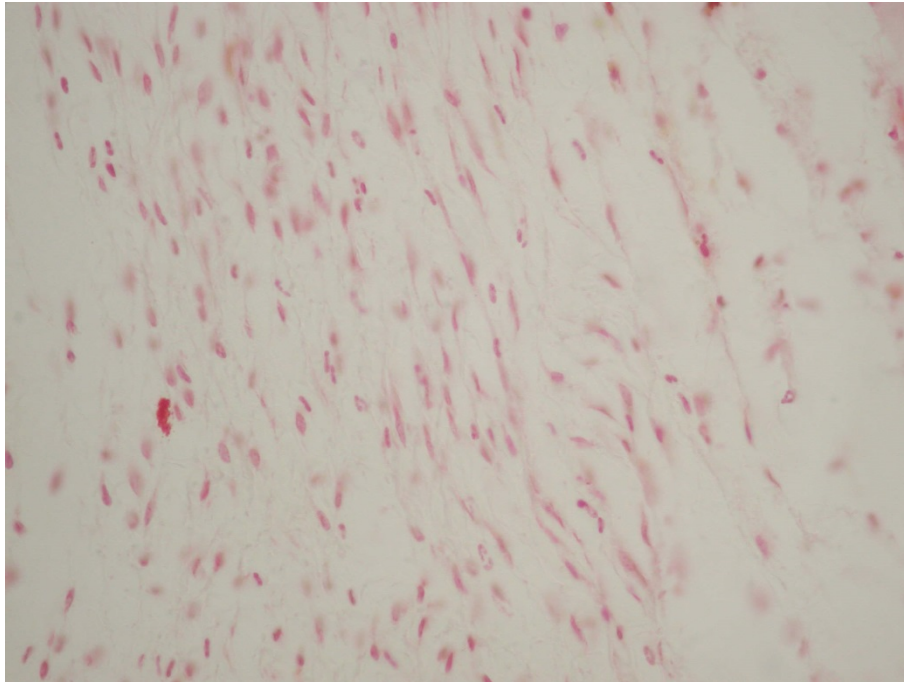


Рис. 6.6. Зона регенерату. Помірна інтенсивність реакції на РНП у цитоплазмі фіброblastів. Інфіковані миші *staphylococcus aureus*, терапія з використанням експериментального гелю з нізином. Реакція Браше, $\times 400$.

По поверхні периферичних відділів регенерату спостерігається новоутворення епідермісу, який у вигляді пласта вростає під струп. Епідерміс нерівномірно потовщений за рахунок гіпертрофії і гіперплазії клітин шипуватий шару (4-6 рядів), вони великих розмірів, світлою цитоплазмою, базофільним ядром, в частині клітин ядра дрібні, пікнотичним, оточені вакуолями з цитоплазматичною рідиною. Ядра клітин росткового інтенсивно сприймають основні барвники, з фігурами мітозу, цитоплазма слабо базофільна. Реакція на ДНП інтенсивна в ядрах клітин базального шару, помірна в ядрах шипуватого шару, та низька у дистрофічно змінених клітинах. Такі ж зміни спостерігаються в цитоплазмі при реакції на РНП. Роговий шар кілька потовщений з осередковим паракератозом.

У прилеглих до зони регенерату тканинах в 30% спостережень зустрічаються судини, просвіти яких облітерировані за рахунок

пролиферуючих ендотеліоцитів, клітин перітелія і адвентиції з формуванням в периваскулярних просторах дрібноосередкових лімфогістіоцитарних інфільтратів, виявляються дрібні фокуси вторинних стромальних та жирових некрозів, дрібноосередкові лейкоцитарні інфільтрати в жировій тканині, дистрофічні зміни в клітинах придатків шкіри. В інших 70% спостережень тканини звичайної гістологічної будови.

Резюме.

У зоні змодельованої рани, інфікованої *pseudomonas aeruginosa*, при лікуванні низином на період завершення експерименту сформована зона регенерату, що має двошарову будову, з епідермізації її периферичних відділів, проте в новоствореному епідермісі в 30% випадків наявні нерізко виражені дистрофічні зміни, а в прилеглих тканинах спостерігаються осередкові запальні та деструктивні зміни (дрібноосередкові лейкоцитарні інфільтрати жирової тканини, продуктивний васкуліт, вторинні стромальні та жирові некрози,

Таким чином, отримані дані дозволяють визначити у експериментальних тварин морфологічні особливості перебігу загоєння рани, при інфікуванні *staphylococcus aureus* при використанні експериментального гелю з низином.

6.6. Морфологічні дослідження шкіри мишей, інфікованих *Pseudomonas aeruginosa*, терапія з використанням експериментального гелю з низином та диклофенаком натрію.

При мікроскопічному дослідженні у препаратах всіх спостережень у зоні попереднього внутрішньошкірного введення мікроорганізмів візуалізується рановий дефект у межах шкіри та підшкірної клітковини, виповнений дозріваючою грануляційною тканиною (зона регенерата) з епідермізацією її.

У зоні регенерату візуалізуються два шари – верхній і нижній. У широкому верхньому шарі зони регенерату візуалізуються тяжі фібробластів,

повнокровні тонкостінні судини, орієнтовані перпендикулярно поверхні шкіри. Базальна мембрана їх при PAS-реакції тонка, рівномірна. Ендотеліоцити зі слабо вираженою реакцією на ДНП в ядрах і помірною реакцією на РНП в цитоплазмі. Фібробласти з інтенсивною реакцією на РНП в цитоплазмі і помірно вираженою реакцій на ДНП в ядрі.

Нижній шар зони регенерату представлений паралельно розташованими пучками помірно фуксинофільних колагенових волокон, щільність і товщина яких наростають у напрямку до периферичних відділів. У зоні регенерату відзначається велика кількість фібробластів, щільність розташування яких наростає у порівнянні з верхнім шаром, зустрічаються нечисленні макрофаги, лімфоцити, ПЯЛ. Фібробласти з інтенсивною реакцією на РНП в цитоплазмі і слабо вираженою реакцій на ДНП в ядрі. Судини з кілька потовщеною помірно фуксинофільних стінкою, в якій диференціюються три тонких шару: ендотелій; шар перицитів, укладених в базальну мембрану; шар адвентиціальних клітин, що лежать серед нижніх колагенових волокон. Ендотелій з набряклою цитоплазмою і округлим базофільним ядром, виступаючим в просвіт судини, цитоплазма з помірно або інтенсивно вираженою реакцією на РНП; ядро з помірною реакцією на ДНП (рис.). Базальна мембрана судин неперервна, помірно PAS-позитивна.

У 70% спостережень зона регенерату повністю покрита епідермальним пластом, у 30 % - на значному протязі, за винятком центральних відділів. Новостворений епідерміс потовщений за рахунок гіперплазії і гіпертрофії клітин переважно шипуватого шару, кількість їх рядів складає від 2 до 5. (рис. 6.7). Ядра базального шару гіперхромні, в локусах гіперплазії з великою кількістю мітозів, інтенсивної реакцією на ДНП. Пухкий роговий шар потовщений, з ділянками гіпер- і паракератозу. У одному спостереженні окремі клітини шипуватого шару мають ознаки вакуольної дистрофії. Базальна мембрана епідермісу PAS-позитивна, безперервна, з ділянками потовщення в осередках гіперплазії. Тканини, що оточують зону регенерата у всіх випадках мають нормальну гістологічну будову (рис. 6.8).

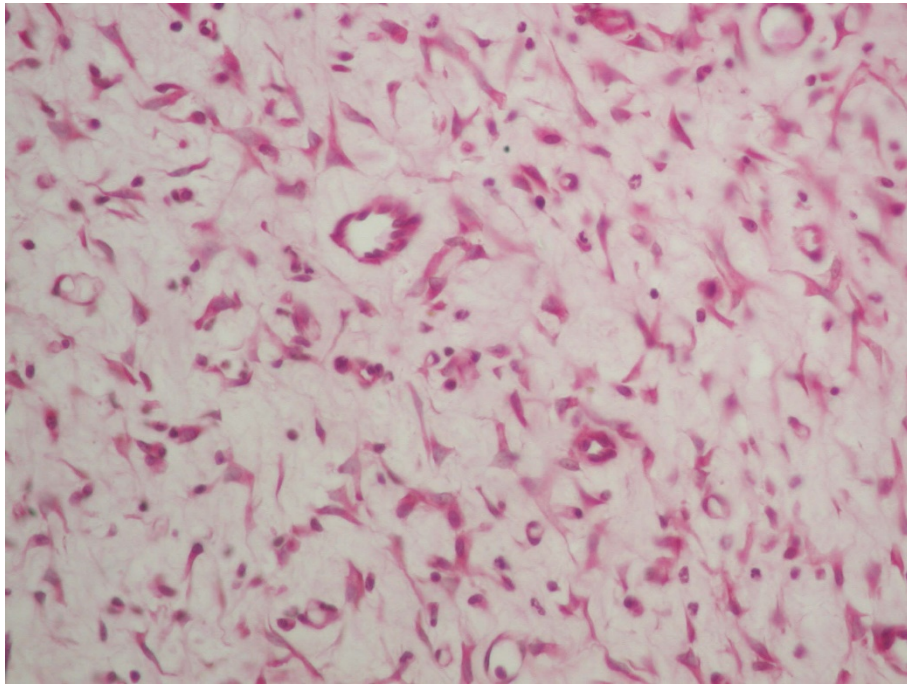


Рис. 6.7. Зона регенерата. Інтенсивна реакція на РНП у цитоплазмі ендотеліоцитів та фібробластів. Інфіковані миші *pseudomonas aeruginosa*, терапія з використанням експериментального гелю з нізином та диклофенаком натрію. Реакція Браше, $\times 400$.

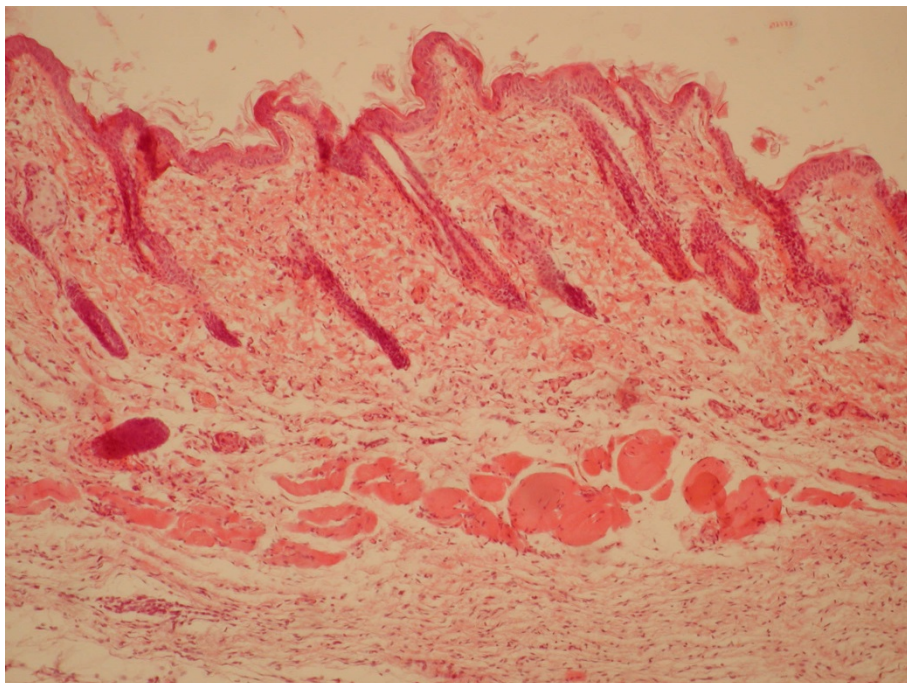


Рис. 6.8. Нормальна будова тканин, що оточують зону регенерату. Інфіковані миші *pseudomonas aeruginosa*, терапія з використанням експериментального гелю з нізином та диклофенаком натрію. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 100$.

Резюме

Дані мікроскопічного дослідження препаратів шкіри мишей досліджуваної групи показали, що при лікуванні тварин гелю з нізіном та диклофенаком натрію на час закінчення експерименту репаративний процес характеризується формуванням безперервної зони регенерату і її активною епідермізацією. Разом з тим в 10% випадків в новоствореному епідермісі зустрічаються слабо виражені дистрофічні зміни, що в цілому не робить негативного впливу на перебіг репаративного процесу.

Таким чином, мікроскопічного дослідження препаратів шкіри мишей з інфікованою *pseudomonas aeruginosa* ранною, що лікувалися гелем з нізіном та диклофенаком натрію, дозволяють визначити морфологічні особливості перебігу репаративного процесу в досліджуваній групі.

6.7. Морфологічні дослідження шкіри мишей, інфікованих *Pseudomonas aeruginosa*, контрольна група без лікування.

Мікроскопічно в препаратах цієї групи в шкіри та підшкірно-жирової клітковини виявляється рановий дефект, вкритий гнійним ексудатом з великою кількістю поліморфноядених лейкоцитів (ПЯЛ), як живих, так і загиблих, колонії бактерій, обривки некротизованих тканин.

Гнійно-некротичний детрит відмежовується від навколишніх тканин шаром набряклої грануляційної тканини (ГТ), яка у верхніх відділах складається з тонкостінних судин, частина з яких мають вертикальну орієнтацією, тяжів фібробластів, значної кількості ПЯЛ (рис. 6.9). Нижче розташований шар складається з горизонтально орієнтованих фібробластів, пухких фуксинофільних колагенових волокон, які в периферичних відділах складаються в тонкі пучки. Тут же розташовуються тонкостінні судини, лімфоцити, макрофаги, ПЯЛ, фібробласти, в останніх часто видно дистрофічні зміни зі зниженням інтенсивності реакції Браше в цитоплазмі, що значно гальмує дозрівання і фіброзування ГТ. Судини в зоні регенерату

різного калібру, розподілені нерівномірно, деякі з них спорожніли. При цьому в судинах спостерігається проліферація ендотеліоцитів, гладеньком'язових клітин, перицитів, інфільтрація стінок ПЯЛ (інфільтративно-продуктивний васкуліт). В ендотеліоцитах спостерігається інтенсивна реакція на ДНП і РНП. Судинна базальна мембрана слабо PAS - позитивна, рихла, нерівномірної товщини. Периваскулярно сформовані лімфоїдно-макрофагальні інфільтрати з домішкою плазматичних клітин.

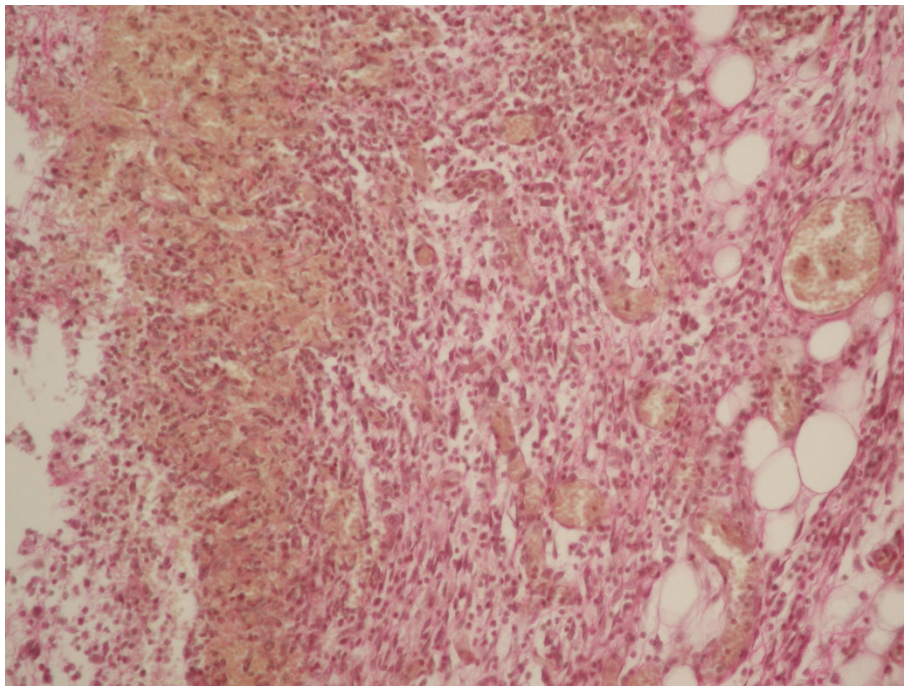


Рис. 6.9. Поверхневий гнійно-некротичний детрит у рані. Інфіковані миші *pseudomonas aeruginosa* – контроль. Забарвлення за ван Гізоном. $\times 200$.

У всіх спостереженнях у краях рани виявляються ознаки незавершеної епідермізації ранового дефекту. Епідерміс нерівномірної товщини з пальцевидними стовщеннями в краях і локусами гіперплазії. Клітини базального шару з ознаками проліферативної і синтетичної активності, ядра клітин з численними фігурами мітозу, гіперхромні з вираженою реакцією на ДНП, в цитоплазмі – на РНП. Кількість рядів клітин шипуватого шару варіює від 4-6 до 10-12 в осередках гіперплазії. У деяких клітинах переважно базального шару спостерігається вакуолізація цитоплазми (вакуольна

дистрофія). Місцями простори між клітинами шиповатого шару розширені за рахунок набряку і виглядають оптично порожніми (спонгиоз). Роговий шар потовщений (гіперкератоз), пухкий, в частині рогових лусочок зберігаються ядра (паракератоз). У основі локусів гіперплазії епідермісу розташовані острівці грануляційної тканини. Придатки шкіри в зоні регенерату не визначаються.

У всіх спостереженнях в дермі та жировій тканині, прилеглих до зони регенерату, виявляються ознаки інфільтративно-продуктивного васкуліту периваскулярними лімфо-макрофагальними інфільтратами з домішкою ПЯЛ, різного розміру осередки вторинного стромального некрозу дерми у вигляді фрагментованих гомогенних волокнистих структур, подекуди з нагноєнням і формуванням мікроабсцесів (рис. 6.10). У жировій клітковині спостерігається більш виражена інфільтрація ПЯЛ з тенденцією к абсцедуванню, загибеллю окремих груп адипозоцитів та їх резорбцією макрофагами, цитоплазма яких переповнюється краплями жиру і набуває клітинний характер.

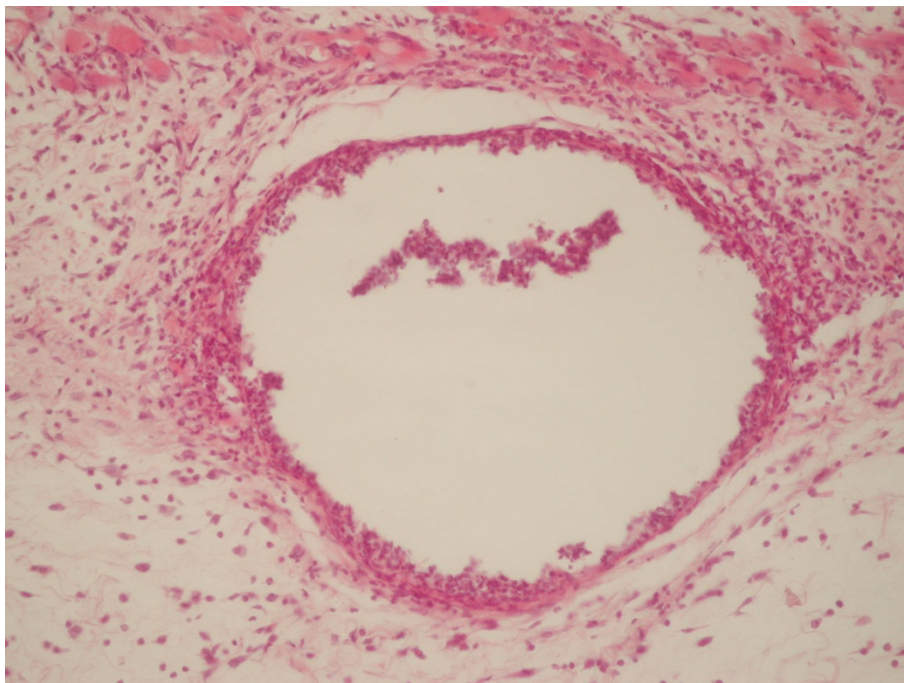


Рис. 6.10. Вторинний великоосередковий стромальний некроз дерми з нагноюванням. Інфіковані миші *pseudomonas aeruginosa* – контроль. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 200$.

Резюме.

Протягом процесу репарації ранового дефекту згідно з даними численних досліджень можна виокремити три фази: травматичного запалення, розвиток сполучної (грануляційної) тканини й епітелізація дефекту, формування й перебудова (ремоделювання) рубця.

Мікроскопічне дослідження препаратів цієї групи тварин показало, що в ділянці введення в шкіру *pseudomonas aeruginosa* в шкірі та підшкірній клітковині до 14-ої доби експерименту утворилась інфікована рана з ознаками репаративного процесу у вигляді новоутворення та дозрівання грануляційної тканини, тобто переважала друга фаза ранового процесу.

Сформований пласт дозріваючої новоствореної сполучної тканини в нижніх відділах характеризується наявністю горизонтальних фіброblastів і накопиченням колагенових волокон, синтетична і проліферативна активність фіброblastів помірно виражена. Тут же зазначається нерівномірний розподіл судин різного калібру, ознаки їх спустошення. Верхні відділи пласта грануляційної тканини складаються з острівців тонкостінних судин, осередково вертикально орієнтованих, і тяжів фіброblastів між ними. Гістохімічно в фіброblastах і ендотеліоцитах спостерігаються інтенсивні белковосинтетической процеси, мітотична активність фіброblastів. Епідермізація рани не є завершеною, новостворений епідерміс є осередковою гіперплазією та дистрофічними змінами клітин.

Разом з гранулюванням та епідермізацією рани зберігаються ознаки запальних процесів як в грануляційній тканині, так і в прилеглих тканинах у вигляді інфільтативно-проліферативних васкулітів, осередкової периваскулярної лімфо-макрофагальної інфільтрації, дифузно-осередкової інфільтрації ПЯЛ, формуванням вторинних стромальних некрозів та некрозів жирової тканини з формуванням мікроабсцесів.

Таким чином, виявлена морфологічна картина процесу загоєння рани характеризується десинхронізацією фаз запалення і регенерації, що виявляється в пролонгуванні запальних змін на тлі ослабленої

макрофагальної реакції і розладів системи мікроциркуляції. Одночасно відбувається гальмування процесів репарації, що може обумовлювати затримку загоєння рани.

6.8 Морфологічні дослідження шкіри мишей, інфікованих *Staphylococcus aureus*, контрольна група без лікування.

При мікроскопічному дослідженні препаратів цієї групи у всіх спостереженнях шкіра та підлегла підшкірно-жирова клітковина з рановим дефектом, виконаним грануляційною тканиною і вкритим широким шаром детриту, у складі якого виявляють уривки епідермісу, слабо фуксинофільних фрагментованих колагенових волокон, просочених гнійним ексудатом з колоніями бактерій.

Грануляційна тканина набрякла з нечітким розподілом на верхній та нижній шари. У верхньому шарі ГТ містить переважно вертикально орієнтовані судини капілярного типу, між ними виявляються тяжі фібробластів, численні ПЯЛ з домішкою макрофагів. Реакція Фельгена-Росенбека та реакція Браше у фібробластах помірно виражена. У нижньому шарі ГТ міститься менша кількість судин, вони різного калібру, розташовані нерівномірно, подекуди спорожнілі. Стінка судин з гіперплазією гладенько-м'язових клітин та перицитів, інфільтрована ПЯЛ. Ендотеліальна вистилка з осередками десквамації та проліферації клітин, з посиленням реакції на ДНП у ядрах та на РНП у цитоплазмі. Базальна мембрана судин стовщена, пухка, нерівномірно PAS-позитивна. Периваскулярно зустрічаються лімфоїдно-клітинні інфільтрати з наявністю плазмоцитів. Між судинами виявляють пучки помірно фуксинофільних колагенових волокон, горизонтально орієнтовані фібробласти, частини яких мають дистрофічні зміни зі зниженням інтенсивності реакції на ДНП у ядрі та на РНП у цитоплазмі. Зустрічаються осередки інфільтрації ПЯЛ грануляційної тканини, подекуди з формуванням мікроабсцесів (рис. 6.11). Придатки шкіри в зоні регенерату не

визначаються.

Біля країв рани спостерігається епідерміс нерівномірної товщини з локусами гіперплазії і пальцеподібним вrostанням під гнійно-тканинний детрит на грануляційну тканину. Базальні епідермоцити з гіперхромними ядрами, численними мітозами, посиленою реакцією на ДНП, у цитоплазмі - на РНП. Кількість рядів клітин шипуватого шару збільшена, в осередках гіперплазії досягає 10-12. Частина базальних і шипуватих епідермоцитів з ознаками вакуольної дистрофії та спонгіозу. У роговому шарі – ознаки гіперта паракератозу (рис. 6.11). Біля основи локусів гіперплазії епідермісу розташовані островці грануляційної тканини. Базальна мембрана епідермісу нерівномірно Pas-позитивна, у локусах гіперплазії потовщена, пухка.

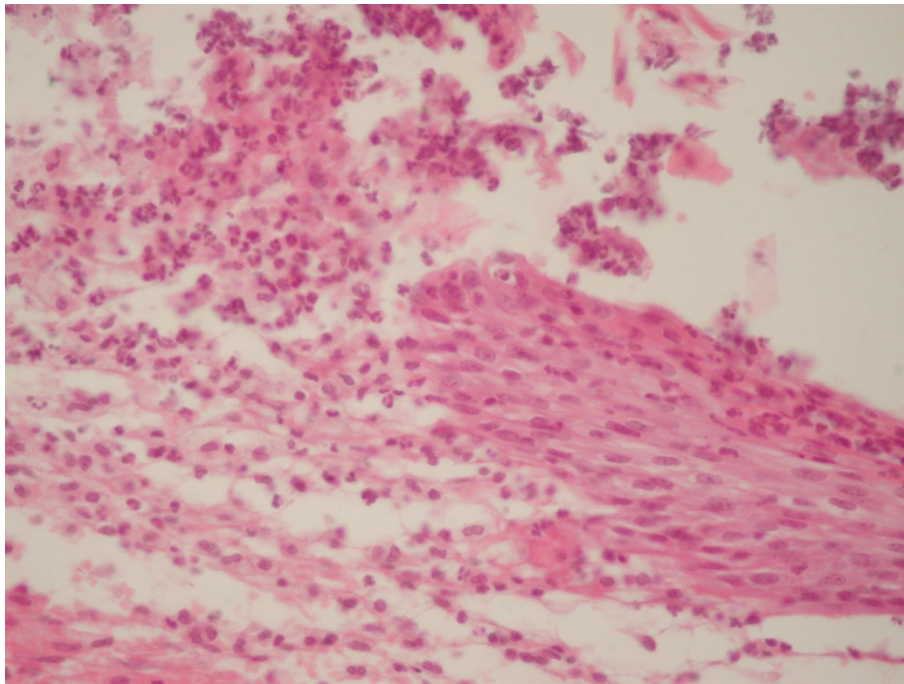


Рис. 6.11. Незакінчена епідермізація рани. Спонгіоз і паракератоз епідермісу. Інфіковані миші *staphylococcus aureus* – контроль. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 400$.

У всіх випадках у тканинах шкіри та підшкірно-жирової клітковини, що оточують зону регенерату спостерігаються явища набряку, у судинах

виявляються ознаки інфільтративно-продуктивного васкуліту з формуванням у периваскулярних просторах лімфоїдно–макрофагальних інфільтратів з більшим або меншим вмістом ПЯЛ, зустрічаються осередки вторинного стромального некрозу дерми, подекуди з нагноєнням; локуси стеатонекрозу та осередково-дифузна інфільтрація ПЯЛ жирової тканини з абсцедуванням (рис. 6.12).

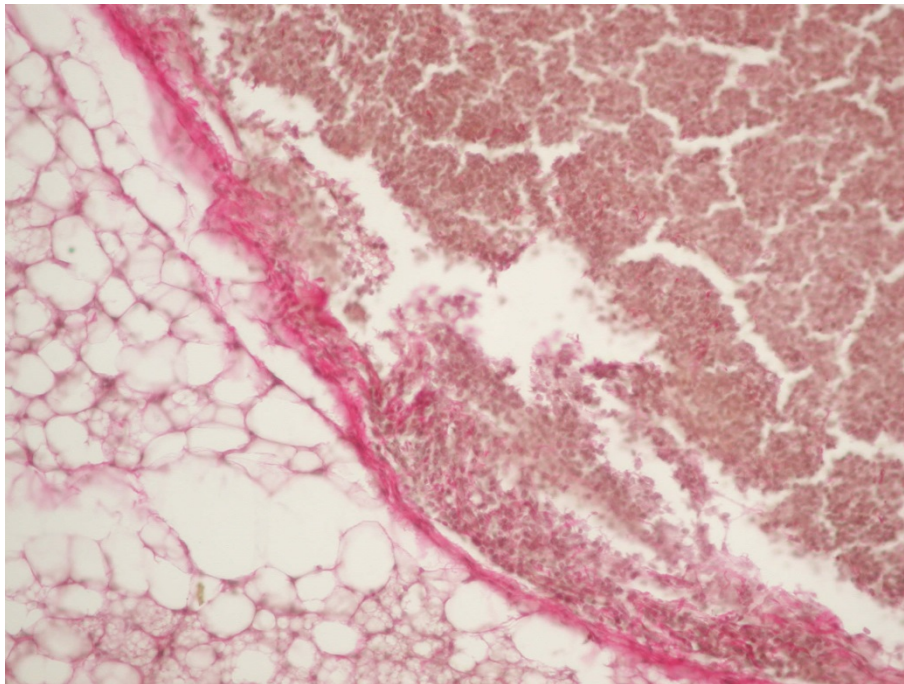


Рис. 6.12. Абсцес підшкірної клітковини. Інфіковані миші *staphylococcus aureus* – контроль. Забарвлення пікрофуксином за ван Гізоном, $\times 200$.

Резюме.

Протягом процесу репарації ранового дефекту згідно з даними численних досліджень можна виокремити три фази: травматичного запалення, розвиток сполучної (грануляційної) тканини й епітелізація дефекту, формування й перебудова (ремоделювання) рубця.

При мікроскопічному дослідженні препаратів цієї групи тварин виявлено, що в ділянці введення в шкіру *staphylococcus aureus* в шкірі та підшкірній клітковині до 14-ої доби експерименту сформована гнійна рана, у

який превалюють ознаки другої фази репарації з утворенням двошарової грануляційної тканини, що знаходиться в стадії дозрівання.

У порівнянні з верхнім шаром у нижньому шарі грануляційна тканина більш зріла, містить більш диференційовані судини, більшу кількість фібробластів зі зниженою проліферативною й синтетичною активністю, більшим вмістом колагенових волокон. Є ознаки незавершеної епідермізації рани з розвитком у новоствореному епідермісі осередкових гіперпластичних та дистрофічних змін.

Поряд з тим, виявляють ознаки пролонгованої першої фази загоювання ран з наявністю у грануляційній тканині та прилеглих тканинах інфільтративно-проліферативного васкуліту з периваскулярною лімфоїдно-макрофагальною інфільтрацією, осередково-дифузною інфільтрацією ПЯЛ, формуванням вторинних стромальних некрозів та некрозів жирової тканини с утворенням абсцесів.

Таким чином, виявлені морфологічні картина процесу загоєння рани характеризується десинхронізацією фаз запалення і регенерації, що виявляється в пролонгуванні запальних змін на тлі ослабленої макрофагальної реакції і розладів системи мікроциркуляції. Одночасно відбувається гальмування процесів репарації, що може призводити до затримки загоєння рани.

6.9 Морфологічні дослідження шкіри інтактних мишей (негативний контроль).

При мікроскопічному дослідженні у препаратах шкіри інтактних мишей візуалізуються її шари - епідерміс і дерма, до якої підлягає підшкірно-жирова клітковина (гіподерма) і м'язи (рис. 6.13). У складі епідермісу (багатошарового плоского епітелію), визначаються три шари: базальний, шипуватий і роговий. Базальний шар епідермісу представлений одним рядом клітин розпластаною форми з овальними ядрами із середнім ступенем

дисперсності хроматину. Ядра клітин добре сприймають основні барвники та дають інтенсивну реакцію на ДНП (Фельгена-Росенбека), подекуди зустрічаються фігури мітозу. В базальному шарі зрідка зустрічаються епідермальні макрофаги (клітини Лангерганса). Шипуватий шар складається з 1-2 рядів клітин полігональної форми кілька менших розмірів у порівнянні з базальними епідермоцитами, ядра їх слабкіше сприймають основні барвники, реакція Фельгена-Росенбека помірно виражена. Реакція Браше (на РНП) в цитоплазмі клітин базального і шипуватий шарів слабкої або помірної інтенсивності. Роговий шар сформований 1-2 рядами тісно прилеглих один до одного без'ядерних еозинофільних рогових лусочок. Базальна мембрана епідермісу візуалізується при PAS-реакції у вигляді безперервної, гомогенної лінії.

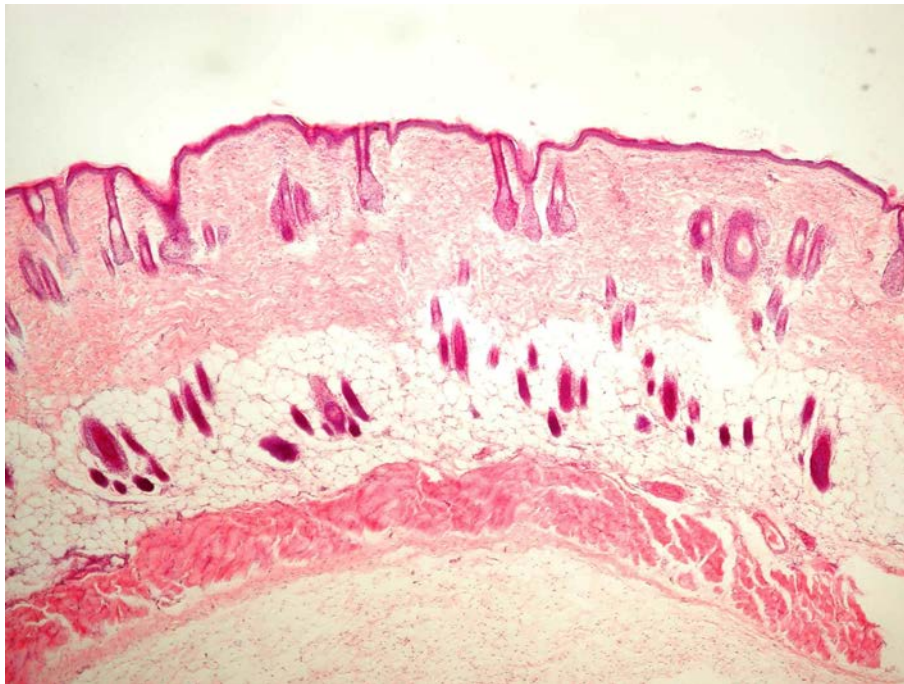


Рис. 6.13. Нормальна гістологічна будова шкіри миші. Група інтактних тварин. Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 40$.

У складі дерми чітко візуалізуються сосочковий та сітчастий шари. Сосочки дерми сплюснені, широкі, сформовані пухкою волокнистою

сполучною тканиною, що складається при забарвленні за ван Гізоном з тонких пучків фуксинофільних цегляно-червоного кольору колагенових і чорного кольору еластичних волокон. Між сполучнотканинними волокнами залягають капіляри, нечисленні клітинні елементи - фібробласти, макрофаги, тканинні базофіли, лімфоцити. Просвіти капілярів добре виражені, помірно заповнені форменими елементами крові. Ендотеліоцити судини, сплюснені зі слабо базофільною цитоплазмою з помірно вираженою реакцією на РНП. Ядра клітин кілька витягнутої форми, добре сприймають основні барвники, в них визначається помірна реакція на ДНП. Судинна базальна мембрана помірно PAS-позитивна тонка, безперервна (рис. 6.14). Периваскулярно місцями визначаються дрібноосередкові макрофагально-лімфоцитарні інфільтрати.

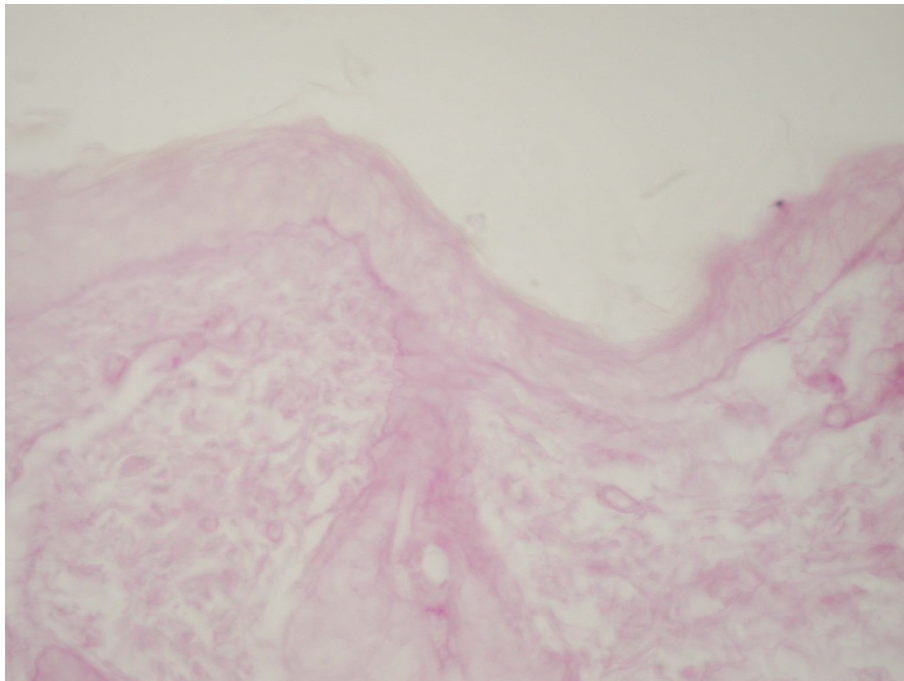


Рис. 6.14. Безперервна, гомогенна, рівномірно виражена базальна мембрана епідермісу, судин дерми. Група інтактних тварин. PAS-реакція, $\times 400$.

Сітчастий шар дерми сформований інтенсивно фуксинофільними

пучками колагенових волокон, їх супроводжує мережа еластичних волокон. Сполучнотканинні волокна орієнтовані у двох напрямках - паралельно поверхні шкіри і під кутом до неї. Між ними визначаються нечисленні фібробласти й фіброцити зі слабо еозинофільною цитоплазмою з помірно або слабо вираженою реакцією Браше в ній. Ядро фібробластів круглястої форми, слабо забарвлюється гематоксиліном, інтенсивність реакції на ДНП слабо виражена. Придатки шкіри представлені волосяними фолікулами і сальними залозами. Коріння волосся оточені тонкою фуксинофільних капсулою, доходять до нижніх відділів сітчастого шару, гирла відкриваються на поверхні шкіри. Епітеліоцити волосяної цибулини мають помірно еозинофільну цитоплазму та велике округле ядро, що помірно сприймає основні барвники. Сальні залози, пов'язані з корінням волосся, складаються з великих клітин з великим округлим ядром, що містить 1-2 ядерця зі слабкою інтенсивністю реакції Фельгена-Россенбека, і оптично світлою цитоплазмою з помірно або слабо вираженою реакцією Браше в ній. Базальна мембрана епітелію волосяних цибулин і сальних залоз при PAS-реакції тонка, безперервна, гомогенна. Судини сітчастого шару, у тому числі капіляри, що розташовані біля основи волосяних цибулин, помірно кровонаповненні, мають тонку слабо PAS-позитивну базальну мембрану, на якій візуалізуються ендотеліоцити зі слабо базофільною цитоплазмою, в якій визначається помірно виражена реакція на РНП. Ядра клітин сплюснені, добре сприймають основні барвники, у них визначається інтенсивна реакція на ДНП. Навколо придатків шкіри зустрічаються дрібновогнищеві лімфогістіоцитарні інфільтрати.

Гіподерма містить невелику кількість жирової тканини, розділеної тонкими фуксинофільними пучками колагенових волокон, що продовжуються з сітчастого шару дерми, серед них візуалізуються дрібні судини, нервові стовбури. Жирові клітини з оптично порожньою цитоплазмою і дрібним базофільним ядром зі слабо вираженою реакцією на ДНП. Нервові стовбури зі слабо базофільною цитоплазмою й круглястими

або дещо витягнутими ядрами, які помірно забарвлюються основними барвниками.

Розташована нижче підшкірної клітковини м'язова тканина представлена поперечно-смугастими м'язовими волокнами з помірно або слабо базофільними паличкоподібними ядрами та еозинофільною цитоплазмою, в якій при PAS-реакції виявляються грудочки глікогену малинового кольору. Групи м'язових волокон поділяють прошарки пухкої волокнистої сполучної тканини, в якій візуалізуються тонкі фуксинофільні колагенові волокна, нечисленні фібробласти, судини. Дрібні артерії гіподерми й м'язового шару помірно кровонаповненні, звивисті, подекуди з ознаками спазму, ендотеліальні клітини в останніх розташовані у вигляді частоколу. Вени дещо звивисті, розширені, повнокровні; ядра ендотеліоцитів чіткі, помірно базофільні, розташовані близько один до одного. Базальна мембрана артерій і вен PAS-позитивна, безперервна.

Резюме.

При комплексному вивченні мікропрепаратів шкіри досліджуваних тварин гістологічна картина, ступінь вираженості гістохімічних реакцій відповідають нормальній будові шкіри миші, що дозволяє розглядати досліджувану групу правильно підбраною як група порівняння.

Висновки до розділу 6:

1. При використанні для лікування експериментальних тварин з раною, інфікованою як *Pseudomonas aeruginosa*, так і *Staphylococcus aureus* експериментального гелю з нізином та диклофенаком натрію в переважній більшості спостережень рановий процес характеризується скороченням стадії травматичного запалення, збільшенням інтенсивності й швидкості епідермізації і формування грануляційної тканини, що призводить до скорочення термінів загоєння таких ран і обумовлює ефективність застосування експериментального гелю з нізином та диклофенаком натрію для лікування цієї патології.

2. При використанні мазі Левомеколь в експериментальних тварин з

інфікованою раною шкіри спостерігається порівняно з контрольною групою зниження вираженості травматичного запалення, прискорення формування й епідермізації грануляційної тканини, що обумовлює доцільність застосування цього препарату для лікування пошкоджень, викликаних дією *Pseudomonas aeruginosa* і *Staphylococcus aureus*. Однак в 40-50% спостережень рановий процес ускладнюється розвитком продуктивного васкуліту з утворенням вторинних стромальних та жирових некрозів, дистрофічними змінами в епідермісі, що може обумовлювати гальмування репаративного процесу.

3. При лікуванні експериментальних тварин з інфікованою раною експериментального гелю з нізином процес загоєння в порівнянні з контрольною групою характеризується зниженням інтенсивності і термінів травматичного запалення, прискоренням гранулювання рани, дозрівання грануляцій та епідермізації, що дозволяє вважати експериментальний гель з нізином препаратом вибору при лікуванні ран, інфікованих *Pseudomonas aeruginosa* і *Staphylococcus aureus*. Разом з тим в 30–40% спостережень має місце явища продуктивного васкуліту з формуванням вторинних некрозів і дистрофічних змін в епідермісі, що може обумовлювати певне уповільнення репаративного процесу.

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ Й УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дисертація присвячена створенню засобу протимікробного впливу на мікроорганізми, збудників локалізованих гнійно-запальних процесів. У роботі обґрунтовано практичне вирішення актуального завдання – створено технологію приготування протимікробних препаратів на основі нізину та визначено його вплив на антимікробну активність на підставі оцінки мікробіологічних, імунологічних та морфологічних ознак. Антимікробна дія препаратів вивчалася по відношенню до *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* та *Escherichia coli*.

Основною метою даних досліджень було визначення максимальної протимікробної активності фармакологічних сумішей. В якості останніх були вибрані: розчин колоїдного срібла (GreenPower (Україна), заявлена виробником концентрація 600 мг/л); розчин AgNO₃ (C = 600 мг/л), фармакологічні композиції нізину та ектерициду.

Антимікробна дія препаратів вивчалася по відношенню до *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa*. Суспензію досліджуваного матеріалу готували за стандартом каламутності так, щоб її концентрація відповідала показникам кожного дослідного мікроорганізму в КУО/мл. Гідроксид амонія в зразках № 1–4 застосовувався для полімеризації гелю з карбополом. У сумішах № 5–7 в якості основи гелю використовували карбоксиметилцелюлозу (КМЦ). Аналіз проведених досліджень показав наявність антимікробної активності у препаратів, які мають в своєму складі нізин та нітрат срібла. Решта препаратів не проявляла бактерицидних властивостей. Даний ефект можна пояснити виробленням резистентності клінічних штамів мікроорганізмів до діючих речовин, що діють, обумовленою їх багаторічним застосуванням в медичній практиці.

Незважаючи на наявність антимікробних властивостей у нітрата срібла та нізина, механізм їх впливу на мікроорганізми не цілком зрозумілий, а

можливість цитотоксичної дії і алергічного впливу AgNO_3 змушує схилитися до застосування більш безпечних бактеріоцинів, тим більше, що активність представлених препаратів приблизно однакова. Тож, наступним етапом проведення досліджень було визначення оптимальної концентрації нізина в фармакологічних композиціях.

При визначенні оптимальної концентрації нізина з антимікробною активністю до штамів *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa* експериментальної суміші наступного складу: 10% NH_4OH – 5 мл; карбопол – 0,2 г; нізин – 0,05 – 0,3 г; $\text{H}_2\text{O}_{(\text{дист.})}$ – до 10 мл встановлено пригнічення розмноження бактерій, як *Staphylococcus aureus*, так і *Pseudomonas aeruginosa*, особливо при впливі на них нізина в кількості до 0,2 – 0,25 г, після чого приріст показника затримки росту знижується. Це дозволяє зробити висновок, що для ефективного застосування нізина як антимікробного засобу проти *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa* вистачить 0,2 – 0,25 г даного препарату. Подальше збільшення його концентрації, в даному випадку, не доцільне.

Для підвищення протизапальних властивостей наведеної суміші, до складу гелю додавали 30 мл 2.5%-ного розчину діклофенаку. Таким чином отримали суміш наступного складу: 70 мл H_2O ; 2 г карбополу; 5 мл 10%-ного NH_4OH ; 30 мл 2,5% розчину діклофенаку. Показано, що додавання діклофенаку підвищує протимікробну активність суміші, причому найбільший вплив спостерігається на зразок *Pseudomonas aeruginosa*.

Колоїдне срібло GreenPower в концентрації 600 мг/л не впливає на пригнічення росту *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas*. Нітрат срібла AgNO_3 в концентрації 600 мг/л пригнічує ріст вищенаведених мікроорганізмів з максимальною ефективністю. Композиції з ектерицидом без нізину не пригнічують ріст досліджених мікроорганізмів.

Фармакологічні суміші з нізином гальмують ріст мікроорганізмів, причому ефективність пригнічення можна порівняти з ефективністю нітрата срібла. На ефективність пригнічення росту мікроорганізмів більш впливає не

концентрація активної речовини, а методика приготування препарату. Найбільш позитивний ефект надає суміш, що містить 70 мл H_2O ; 2 г карбополу; 5 мл 10%-ного NH_4OH ; 30 мл 2,5% розчину диклофенаку. Пригнічення *Pseudomonas aeruginosa* спостерігається більш суттєво, ніж *Staphylococcus aureus*. Оптимальна концентрація нізину в композиції складає $0,2 \div 0,25$ г на 10 мл суміші. Підвищення цієї концентрації призводить до додаткової витрати нізину, при цьому ефективність пригнічення суттєво не змінюється.

Модифікація композицій нізину додаванням диклофенаку позитивно впливає на антимікробну активність препарату, причому найбільше пригнічення спостерігається для *Pseudomonas aeruginosa*.

Наступним етапом дослідження було вибір речовини для створення гелевої основи м'якої лікарської форми для лікування гнійних уражень шкіри з нізином в якості активної речовини та визначення реологічних, структурно-механічних і фізико-хімічних властивостей отриманої композиції. З огляду на те, що даний гель надалі планується використовувати в якості носія препарату для лікування гнійних ран, наведені дослідження проводили спираючись на вимоги, які пред'являються до носіїв лікарських препаратів, а саме: речовина повинна мати необхідні консистентні властивості, не змінюватися під дією зовнішніх чинників, мати хімічну інертність, не чинити подразнюючої та сенсibiliзуючої дії, має зберігати первинний рН шкіри і слизової оболонки; не піддаватися контамінації; змиватися водою, не бути занадто липким

Результати регресійного аналізу показали, що в'язкість колоїдного розчину КМЦ знижується з підвищенням температури розчинника, а функція цього процесу підпорядковується квадратичної залежності. Однак якщо температурний інтервал незначний, для визначення в'язкості гелю можливо застосовувати класичні методи інтерполяції.

Наведені дослідження дозволяють оптимізувати температурні умови розчинення КМЦ для утворення гелю потрібної консистенції.

Не менш важливою складовою для створення композицій на основі КМЦ є її концентрація, від якої залежать не тільки фізико-хімічні властивості гелю, але й здатність розчину зберігати свою стабільність протягом потрібного терміну, тому наступним етапом було проведення досліджень щодо впливу концентрації КМЦ на в'язкість отриманого гелю. Дослідження показали, що збільшення концентрації розчиненої КМЦ сприяє підвищенню умовної в'язкості гелю і ця залежність є квадратичною. Розрахована за допомогою регресійного аналізу емпірична функція дає можливість застосувати звичайні математичні засоби прогнозування умовної в'язкості гелів для різних концентрацій КМЦ, коли її визначення за допомогою віскозиметра є неможливим.

Основною метою наступного етапу досліджень було визначення стабільності препарату старінням в нормальних умовах з подальшим прогнозуванням його терміну експлуатації. Оцінка стабільності досліджуваних зразків проводилася на основі таких показників якості як зовнішній вигляд, рН і в'язкість продукту. Також визначалася щільність розчинів, однак протягом усього терміну досліджень тут змін не спостерігалось, тому ці показники брали за константу. Дослідження проводилися до того моменту, коли починали спостерігатися істотні зміни наведених вище показників.

Як показали дослідження зовнішнього вигляду гелів, найбільш стабільним виявився розчин з чистою КМЦ без модифікації. Протягом всього терміну старіння (3 місяці) зовнішні показники цього гелю не змінилися. Модифікація даного розчину гліцерином сприяла тому, що розчин придбав блідо-жовтий колір і з'явився специфічний гнильний запах. Інші розчини відрізнялися від двох попередніх тим, що були приготовлені з додаванням аскорбінової кислоти. Така модифікація надала первинним гелям жовте забарвлення, однак при подальшому зберіганні колір досить потемнів і перетворився практично в коричневий, а в обсязі розчинів з'явилася слиз. Запах при цьому не змінився. Детальні дослідження величини водневого показника гелів протягом усього етапу старіння показали, що рН розчинів,

які були приготовлені з КМЦ без модифікації, а також колоїдів з модифікацією гліцерином, поступово знижується, при цьому встановлено, що зниження кислотності на другому зразку більш виражено ніж в немодифікованому зразку. Тоді як водневий показник першого гелю знизився на 5,7%, проте залишився в слабо основний області, кислотність модифікованого гелю знизилася на 19,3% і змістилася з слаболужної в слабокислу область.

Інший характер залежностей спостерігається у зразків, які були модифіковані аскорбіновою кислотою і її сумішшю з гліцерином. В цьому випадку водневий показник зростає на протязі двох місяців, після чого починається його зниження. Функції зміни рН для цих двох зразків мають лінійний вигляд і майже не відрізняються між собою: протягом двох місяців спостерігається рівномірний ріст водневого показника, після чого починається його рівномірне зниження. Втім коливання рН в цих розчинах є незначним і не перевищує 0,5 одиниць. Це доводить, що таким гелям вдається стабільно зберігати рН в межах слабокислою середовища.

Наступним кроком на етапі визначення стабільності отриманих колоїдів були дослідження зміни в'язкості зразків протягом терміну зберігання. Можна стверджувати, що дані дослідження були базовими серед проведених випробувань з огляду на те, що в'язкість є основною характеристикою, яка визначає якість отриманих гелів. Аналіз даних показав, що тенденція зміни в'язкості гелів, які були модифіковані аскорбіновою кислотою, істотно відрізняється від розчинів, які були приготовлені тільки з використанням КМЦ і гліцерину, тому функції даних процесів розглядалися окремо. Встановлено, що старіння гелів, які були приготовлені без використання аскорбінової кислоти, протягом першого місяця протікає повільно. В'язкість зменшується несуттєво, а на зразку, який був модифікований гліцерином, навіть трохи збільшується. Потім, спостерігається різке зниження в'язкості у 2,5–3 рази від початкових значень, після чого падіння знову сповільнюється. Загальний вигляд функцій цього

процесу можна представити, як сигмоїдальні залежності з виходом на асимптоту.

Тож, найбільш стабільними є розчини, які приготовлені з чистою КМЦ без застосування модифікаторів. Вони мають початкову в'язкість, яка найбільш повно відповідає вимогам, що пред'являються до фармацевтичних препаратів і зберігають свої властивості протягом місяця. Додавання до наведеного розчину гліцерину майже не змінює його рН, проте знижує початкову в'язкість і сприяє зменшенню стабільності. Доведено, що розчин з гліцерином не має виражених антимікробних властивостей, а додавання аскорбінової кислоти змінює рН середовища в кислу область, що призводить до різкого зниження початкової в'язкості і прискоренню процесу синерезиса. Спроби скорегувати стабільність таких розчинів додаванням гліцерину не дали позитивного результату.

Наступним етапом дослідження було приготування гелю на основі карбополу, а саме: залежно від запланованої концентрації розчину до необхідного обсягу дистильованої або деіонізованої води додавали потрібну кількість сухого порошку карбополу. Суміш перемішували механічною мішалкою до утворення однорідної гелелеподібної речовини без наявності грудок та згустків. Після цього до отриманої суміші додавали 10% NH_4OH для нейтралізації водної суспензії. Після створення гелю карбополу внаслідок його взаємодії з водою, кислотність колоїду складала рН = 3. Додавання гідроксиду амонію призводило до поступової нейтралізації розчину та зсуву його рН в лужну сторону. При цьому спостерігалось значне збільшення в'язкості суспензії. Оптимальну в'язкість фармакологічного гелю на основі карбополу можна досягнути нейтралізацією суміші до значень нейтрального середовища. Залежно від необхідної в'язкості препарату, значення водневого показнику рН гелевої композиції може коливатись від 5 до 10 і ця невибагливість до меж кислотності може вважатись ще однією перевагою композицій на основі карбополу.

Наступним етапом роботи було з'ясування впливу концентрації та карбополу на в'язкість отриманого гелю. Досліди проводились як до додавання нейтралізатора, так і після нейтралізації 10%-ним NH_4OH . Результати дослідження показали, що збільшення кількості гелеутворювача сприяє підвищенню умовної в'язкості гелю. Причому додавання нейтралізатора позитивно впливає на цей процес, значно збільшуючи умовну в'язкість. В обох випадках залежності підпорядковуються експонентним функціям. На зразках без додавання NH_4OH це $\eta = e^{0,137505+2,90782 \times \ln(C)}$; після додавання нейтралізатора – $\eta = e^{4,79119+0,606923 \times \ln(C)}$. Як видно, функції мають однаковий вигляд і відрізняються лише коефіцієнтами, що свідчить про однакову природу протікання фізико-хімічних процесів як без нейтралізатора, так і сумісно з ним. Кінетична стабільність отриманого розчину карбополу вивчалась шляхом його витримання при нормальних умовах. Впродовж строку зберігання періодично вимірювались показники в'язкості та кислотності.

Здобуті дані показують, що тривалість зберігання впродовж двох місяців практично не впливає на умовну в'язкість розчину карбополу. Це дозволяє зробити висновок, що на відмінність від гелів карбоксиметилцелюлози, даний препарат можна використовувати в якості гелеутворювача для основи фармакологічних препаратів.

Таким чином, встановлено, що додавання модифікаторів до розчинів КМЦ знижують їх в'язкість до таких характеристик, що використання даних композицій в якості м'яких лікарських форм стає неможливим. Всі досліджувані розчини карбоксиметилцелюлози втрачають свою консистенцію, змінюючи фізико-хімічні характеристики впродовж трьох місяців зберігання в звичайних умовах. Технологія приготування гелів з карбополу є простою, не вимагає багато часу та не потребує особливої кваліфікації робітників. Для приготування гелю з карбополу потрібна незначна кількість сухої речовини, що знижує собівартість препаратів на його основі. М'які лікарські форми на основі карбополу мають

довготривалий термін зберігання, що сумісно з відповідними реологічними характеристиками, робить такі композиції придатними до використання в якості фармакологічних комерційних препаратів.

Встановлення дії композитів з нізином було перевірено в експерименті *in vivo* на моделях локалізованої гнійно-некротичної рани у лабораторних тварин. Пошкодження шкіри супроводжується каскадом різноманітних біохімічних реакцій, які обумовлюють розвиток запального процесу, а також забезпечують компенсацію порушених функцій клітин, тому вивчення показників зсувів метаболізму при розвитку запалення і нагноєння в теперішній час все ще є актуальними.

У результаті дослідження виявлено зміни показників нітродоксидергічного обміну в сироватці крові мишей, а саме NO, який є однією з ключових ланок окисного стресу. Результати показали, що вже на початку спостереження (4-а доба), в період інтенсивного розвитку запалення у сироватці крові тварин усіх дослідних груп мало місце суттєве підвищення цього показника більш ніж удвічі ($P < 0,05$). Найвищі показники були характерні для груп контрольної патології (групи тварин з інфікованими ранами, які не підлягали лікуванню). У подальшому у мишей контрольних груп спостерігалось поступове зниження вмісту mNO , але й наприкінці дослідження (16-а доба) їх концентрація вірогідно перевищувала рівень в інтактних тварин.

Використання досліджуваних засобів (гель з нізином, гель з нізином і диклофенаком, мазь Левомеколь) для лікування інфікованих ран надавало вираженого ефекту на рівень mNO . І хоча ці засоби повністю не стримували процесів нітродоксидергічного обміну в період найбільшого прояву запалення (4-а доба) спостережень, але їх застосування дозволило знизити накопичення метаболітів оксиду азоту на 8-у добу у всіх лікованих тварин. До кінця дослідження (16-а доба) вміст mNO у сироватці крові мишей, які отримували гель зразок 4, рівень mNO повністю відповідав рівню в інтактних тварин. В інших лікованих групах вміст mNO також суттєво знижувався, але повністю не

досягав рівня норми, зберігаючи тенденцію до підвищення, хоча розбіжності були невірогідними.

У дослідних тварин проводилося також вивчення концентрації в сироватці крові стабільних кінцевих метаболітів оксиду азоту – нітратів і нітритів. Дані показали, що в цілому динаміка порушень вмісту нітратів співпадала з динамікою змін рівня mNO . Вірогідне підвищення показників під час усього спостереження було притаманне лише групам контролю патології. У лікованих тварин підвищення даного показника навіть у період інтенсивних запальних реакцій (4-а доба) був суттєво меншим, ніж у контрольних групах. У подальшому рівень нітратів постійно зменшувався і наприкінці спостережень (16-а доба) у групах з використанням гелю зразок 4 повністю нормалізувався. У групах з використанням препаратів порівняння (гель зразок з нізином та мазь Левомеколь) вміст нітратів наближався до інтактного рівня, але все ж зберігав тенденцію до підвищення.

Таким чином, виявлено, що в результаті розвитку локалізованої інфекції посилюється активність вільнорадикальних процесів в організмі, зокрема синтез оксиду азоту. Під дією медіаторів запалення відбувалося тривале підвищення синтезу оксиду азоту і його метаболітів, особливо в період інтенсивного розвитку запалення (4-а доба).

В результаті проведеного дослідження виявлено позитивний вплив на процеси нітродергичного обміну гелів, які містили нізин. При чому, отримані дані показали виражений позитивний вплив локального застосування нізину, а також його комбінації з диклофенаком на нормалізації рівня оксиду азоту у сироватці крові.

При вивченні цитокінового профілю в крові мишей при лікуванні інфікованих ран було встановлено, що при утворенні інфікованих ран в сироватці крові мишей в період активного формування запалення (4-а доба) відзначалося суттєве підвищення вмісту прозапального ІЛ-1 β . В групах мишей з контрольною патологією рівень ІЛ-1 β зростав у 4,7 рази відносно інтактного рівня. Ріст цього показника в групах мишей, які отримували

місцеве лікування, був більш стриманим і складав 2,6 – 3,3 рази, що було вірогідно менше, ніж в контрольних групах.

Подальше загоювання ран (8 – 16-а доба) зменшувало інтенсивність утворення ІЛ-1 β , але значення показника зоставалося вірогідно вищим за рівень у інтактних тварин в усі терміни спостереження.

Проведене місцеве лікування із застосуванням гелів з нізином та нізин + диклофенак, а також мазі Левомеколь спричиняло позитивний ефект на стан загального імунітету: рівень ІЛ-1 β у мишей усіх лікованих груп поступово зменшувався, але тільки в групах с використанням геля зразок 4 наприкінці експерименту (16-а доба) спостерігалось повне відновлення вмісту даного цитокіну. В групі із застосуванням гелю зразок 8 рівень ІЛ-1 β зберігав тенденцію до підвищення, хоча значення показників були вірогідно нижчими за показники в групах контролю патології. В групі з використанням мазі Левомеколь (препарат порівняння) рівень даного цитокіну також поступово знижувався, але в останні терміни спостереження (16-а доба) значення показника, хоча і були суттєво нижчі, ніж в групах контролю, але все ж таки вірогідно перевищували рівень інтактних тварин.

Картина динаміки показників протизапального ІЛ-4 була іншою: базовий рівень цього цитокіну був набагато нижчий за ІЛ-1 β . І навіть після утворення гнійних ран (4-а доба) інтенсивність синтезу протизапального цитокіну була в середньому лише на 36% вища за інтактний рівень ($P < 0,05$). В подальшому рівень ІЛ-4 в групах мишей з контрольною патологією поступово зростав і на 16-у добу був вже майже в 2 рази вищий за інтактний рівень.

При застосуванні місцевого лікування підвищення показника було більш суттєвим. Вже на 4-у добу рівень ІЛ-4 в групах лікованих тварин був вірогідно вищим не тільки за показники в інтактній групі, а й у 1,5 – 2 рази перевищував рівень в групах контролю патології. Найбільш значними були показники в групі з місцевим застосуванням гелю 3 нізином та диклофенаком.

Аналізуючи отримані дані можна сказати, що розвиток запального процесу при утворенні інфікованих ран супроводжувався суттєвими змінами стану імунних механізмів захисту організму. Це проявлялося в змінах вмісту в сироватці крові цитокінів різноспрямованої дії: синтез прозапального ІЛ-1 β з перших днів утворення інфікованої рани був суттєво підвищений, що свідчило про інтенсивний перебіг гнійно-некротичного процесу; а вміст протизапального ІЛ-4 зростав поволі через підвищену активність прозапальних чинників. Імовірно, це відбувалося через місцеві зміни складу клітин крові в осередку запалення, в тому числі кількісного співвідношення популяцій і субпопуляцій лімфоцитів, розбалансування нейро-гуморальної регуляції, а також за рахунок посилення загальної імунної відповіді організму на пошкодження шкіри і бактеріальну агресію.

Такі зміни динаміки різних медіаторів варіювали в залежності від періоду формування ранового дефекту, оскільки відображали процеси місцевого запалення і активацію імунних механізмів захисту. Переважання в складі клітин, які мігрували в осередок, поліморфоядерних і мононуклеарних лейкоцитів і підвищена активність фагоцитів індукувало ріст вмісту прозапальних цитокінів, перш за все ІЛ-1 β , який ми спостерігали в нашому дослідженні. Ріст при утворенні інфікованих ран концентрації в сироватці крові ІЛ-1 β вказував на надмірне напруження в підтримці клітинної та гуморальної імунної відповіді. У той же час повільний ріст рівню ІЛ-4 свідчив про наявну недостатність місцевих механізмів імунітету. Це узгоджується з даними літератури про регуляторну дію ІЛ-1 β на ранніх етапах загоювання рани на синтез других цитокінів та ростових факторів.

Застосування гелів з нізином та нізин + диклофенак, а також мазі Левомеколь для проведення місцевого лікування пошкоджень шкіри спричиняло позитивний ефект на стан загального імунітету: рівень ІЛ-1 β у мишей усіх лікованих груп поступово зменшувався, а рівень ІЛ-4 в групах лікованих тварин був вірогідно вищим не тільки за показники в інтактній групі, а й перевищував рівень в групах контролю патології. Найбільш

значними були показники в групі з місцевим застосуванням гелю з нізином.

При визначені морфологічних змін тканин осередку експериментального ураження за дії протимікробних композитів з нізином та без було встановлено, що при лікуванні маззю «Левомеколь» мишей з раною шкіри, інфікованою *Pseudomonas aeruginosa*, мікроскопічно до 14-ї доби експерименту явища травматичного запалення йдуть на другий план і переважають ознаки другої фази процесу загоєння: сформована двошарова зона регенерату, епідермізація у порівнянні з групою без лікування носить більш розповсюджений характер. Разом з тим, в 50% спостережень у тканинах, що оточують зону регенерату, зберігаються нерізко виражені запально-деструктивні явища у вигляді продуктивного васкуліту, осередкової запальної інфільтрації та формуванням вторинних дрібноосередкових стромальних та стеатонекрозів. Одже, отримані дані дозволяють визначити морфологічні особливості перебігу ранового процесу у мишей з раною шкіри, інфікованою *Pseudomonas aeruginosa*, при лікуванні маззю «Левомеколь».

При моделюванні інфікованого *Pseudomonas aeruginosa* ранового процесу та лікуванні нізином по завершенні експерименту превалює друга фаза загоєння, що морфологічно підтверджується формуванням двошарової зони регенерату та епідермізацією її периферичних відділів. Разом з тим у 40% випадків у тканинах, що оточують зону регенерату, подекуди спостерігаються явища продуктивного васкуліту з розвитком вторинних стромальних та жирових некрозів, зустрічаються дрібноосередкові лейкоцитарні інфільтрати жирової тканини, з них у 20% випадків у складі клітинних інфільтратів переважають еозинофільні лейкоцити, що також спостерігаються в зоні регенерату. У новоствореному епідермісі виявляються слабо виражені дистрофічні зміни. Таким чином, дані, що отримані під час морфологічного дослідження, дозволяють визначити на експериментальному матеріалі особливості перебігу загоєння рани, що інфіковані *Pseudomonas aeruginosa* та лікуванні експериментальним гелем з нізином.

Дані мікроскопічного дослідження препаратів шкіри мишей з інфікованою *Staphylococcus aureus* раною і лікуванням експериментальним гелем з нізином та диклофенаком натрію свідчать про те, що наприкінці сформувався двошаровий регенерат і здійснюється процес його епідермізації, проте в 10% випадків в прилеглих до зони регенерату тканинах зустрічаються дрібні осередки вторинних стромальних та жирових некрозів, у 30% спостережень у новоствореному епідермісі виявляються дистрофічні зміни окремих клітин. Знайдені зміни на наш погляд суттєво не впливають на темпи процесу репарації. Таким чином, дані мікроскопічного дослідження препаратів шкіри мишей з інфікованою *Staphylococcus aureus* раною, що лікувалися експериментальним гелем з нізином та диклофенаком натрію дають можливість оцінити морфологічні особливості перебігу репаративного процесу в досліджуваній групі.

В зоні змодельованої рани, інфікованої *Staphylococcus aureus*, при лікуванні нізином на період завершення експерименту сформована зона регенерату, що має двошарову будову, з епідермізації її периферичних відділів, проте, в новоствореному епідермісі в 30% випадків мають місце нерізко виражені дистрофічні зміни, а в прилеглих тканинах спостерігаються осередкові запальні та деструктивні зміни (дрібноосередкові лейкоцитарні інфільтрати жирової тканини, продуктивний васкуліт, вторинні стромальні та жирові некрози. Таким чином, отримані дані дозволяють визначити у експериментальних тварин морфологічні особливості перебігу загоєння рани, при інфікуванні *Staphylococcus aureus* при використанні експериментального гелю з нізином.

Дані мікроскопічного дослідження препаратів шкіри мишей досліджуваної групи показали, що при лікуванні тварин гелем з нізином та диклофенаком натрію на час закінчення експерименту репаративний процес характеризується формуванням безперервної зони регенерату і її активною епідермізацією. Разом з тим, в 10% випадків у новоствореному епідермісі зустрічаються слабо виражені дистрофічні зміни, що в цілому не робить

негативного впливу на перебіг репаративного процесу.

Таким чином, мікроскопічного дослідження препаратів шкіри мишей з інфікованою *Pseudomonas aeruginosa* ранною, що лікувалися експериментальним гелем з нізином та диклофенаком натрію, дозволяють визначити морфологічні особливості перебігу репаративного процесу в досліджуваній групі.

Отже, в результаті проведеного дослідження вперше експериментально доведений позитивний протимікробний вплив бактеріоцину нізину проти *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosae* в умовах *in vitro*. Доповнено наукові дані щодо застосування мазей з протимікробними властивостями, а саме – за допомогою дослідів *in vivo* показано, що для лікування контамінованих відкритих ран найбільш ефективним способом доставки нізину в осередок інфікування є його нанесення на поверхню рани у вигляді м'якої лікарської форми. Отримали подальший розвиток наукові положення щодо вдосконалення методів створення основ для антибактеріального гелю на підставі проведених реологічних, структурно-механічних та фізико-хімічних досліджень, які показали, що для створення м'яких лікарських форм з активною речовиною нізином найбільш придатними є гідрофобні гелеві композиції на основі карбополу.

Вперше визначені оптимальні параметри та розроблена технологія приготування антибактеріального гелю для лікування інфікованих ран на основі карбомеру карбополу з активною речовиною у вигляді бактеріоцину нізину. На основі поглибленого вивчення протимікробних властивостей протимікробних гелів показано позитивний вплив додавання до складу розробленої антимікробної композиції комерційного НПЗ «Діклофенак», шляхом зменшення запального процесу у рані. Вперше експериментально на підставі проведених дослідів *in vivo* доведена ефективність застосування розробленої гелевої композиції в процесі лікування запальних ран; показано пригнічення розвитку хвороботворних *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosae*, сформована тимчасова полімерна захисна оболонка поверхні

шкіри полікомпонентним гелем з антимікробною дією, що сприяє попередженню інфікування, зумовлює прискорення регенеративних процесів зменшення кількості рубцюватої тканини та прискорює епітелізацію рани, що призводить до скорочення строків лікування хворих у стаціонарах та зниженню ліжко-місць.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі теоретично обґрунтовано та вирішено актуальне наукове завдання – досліджений протимікробний вплив природного антибіотику нізину на клінічні штами *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* та *Escherichia coli*. Експериментально створений лікарській препарат у вигляді м'якої лікарської форми, який містить нізин в якості протимікробного агенту та карбопол, що виконує роль гелевої основи. Доведено ефект пригнічення хвороботворної мікрофлори в експериментах *in vitro* та *in vivo*. Сприятливий вплив розробленої фармацевтичної композиції доведено мікробіологічними, біохімічними та морфологічними дослідженнями.

1. Досліджуванні *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* та *Escherichia coli* мають високий рівень адгезивної та ферментативної активності, здатні формувати щільні біоплівки, активно формувати вторинні біоплівки, що робить їх полірезистентними до антибіотиків.

2. Фармакологічні суміші з нізином гальмують ріст мікроорганізмів, причому на ефективність пригнічення росту більш впливає не концентрація активної речовини, а методика приготування препарату та його склад.

3. Максимальне пригнічення бактерій надає суміш: 70 мл H_2O ; 2 г карбополу; 5 мл 10%-ного NH_4OH ; 30 мл 2,5% розчину диклофенаку. Пригнічення *Pseudomonas aeruginosa* спостерігається більш суттєво, ніж інших досліджених мікроорганізмів.

4. Пригнічення росту найефективніше відбувається за впливу гелів, які мають в своєму складі добавки деякої кількості комерційного препарату Диклофенак.

5. Технологія приготування гелів з карбополу є простою та не довготривалою, а саме приготування препарату не потребує значної кількості сухої речовини, що знижує собівартість препаратів на його основі. М'які лікарські форми на основі карбополу мають довготривалий термін зберігання

та відповідні реологічні характеристики, що робить такі композиції придатними до використання в якості фармакологічних комерційних препаратів.

6. Утворення інфікованих ран викликало істотне підвищення рівня метаболітів оксиду азоту (NO) в сироватці крові, що свідчило про розвиток в організмі оксидативного стресу та ендогенної інтоксикації. Це приводило до зміни імунних механізмів захисту організму. Синтез прозапального ІЛ-1 β з був суттєво підвищений, що свідчило про інтенсивний перебіг гнійно-некротичного процесу; а вміст протизапального ІЛ-4 зростав через підвищену активність прозапальних чинників. Застосування гелю з нізином та суміші нізин + диклофенак, а також мазі Левомеколь для проведення місцевого лікування інфікованих ран справляло позитивний ефект на нітросидергичний обмін і стан загального імунітету.

7. При лікуванні піддослідних тварин, інфікованих *Pseudomonas aeruginosa* і *Staphylococcus aureus* експериментальним гелем з нізином та диклофенаком натрію в переважній більшості спостережень рановий процес характеризується скороченням стадії травматичного запалення, збільшенням інтенсивності і швидкості епідермізації і формування грануляційної тканини, що призводить до скорочення термінів загоєння ран і обумовлює ефективність його застосування експериментального гелю з нізином та диклофенаком натрію для лікування даної патології.

8. В експериментах на лабораторних тваринах *in vivo* доведена ефективність застосування антимікробних препаратів на основі карбополу з активною речовиною нізином. Лабораторні миші, яких лікували розробленим препаратом повністю видужували від зараження клінічними штамами за 16 діб лікування.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Мікробіологічно обґрунтовано застосування антимікробних сумішей на основі карбополу з активною речовиною нізином, що дозволяє рекомендувати їх до подальшого дослідження на експериментальних моделях з локалізованими гнійно-запальними процесами та розробки ефективних лікарських препаратів для протимікробної терапії.

Для приготування протимікробного гелю оптимально використовувати такий склад суміші: 70 мл H_2O ; 2 г карбополу; 5 мл 10%-ного NH_4OH ; 30 мл 2,5% розчину диклофенаку. Оптимальна концентрація нізину в розчині складає 2–2,5 %. Присутність в даній суміші препарату «Діклофенак» підвищує ефективність гелевої композиції.

М'які лікарські форми на основі карбополу мають довготривалий термін зберігання та відповідні реологічні характеристики, а приготування гелів з карбополу в якості основи не є кошторисним та довготривалим, що знижує собівартість препаратів на його основі та дає можливість їх використання в якості фармакологічних комерційних препаратів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Третьяков А.А. Лечение гнойных ран / А.А. Третьяков, С.В. Петров, А.Н. Неверов, А.Ф. Щетинин. // *Новости хирургии.*– 2015.– 23(6).–С.680–687.
2. Левчук И.П. Антибактериальные препараты для местной терапии ранений различной этиологии / И.П. Левчук, М.В. Костюченко // *Медицинское обозрение.*– 2018.– 2(2).– С. 64–68.
3. Гунар О.В. Антисептические лекарственные препараты и анализ их качества по микробиологическим показателям. / О.В. Гунар, Н.Г. Сахно // *Ведомости НЦЭСМП.*– 2012.– №4.– С. 45–49.
4. Oscáriz J.C., Pisabarro A.G. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. // *Int Microbiol.*– 2001.– 4(1).– P.13-19. doi: 10.1007/s101230100003.
5. Piwowarek K, Lipińska E, Hać-Szymańczuk E, Kieliszek M, Ścibisz I. Propionibacterium spp.-source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry. // *Appl Microbiol Biotechnol.*– 2018.– 102(2).– P. 515-538. doi:10.1007/s00253-017-8616-7.
6. Mokoena M.P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. // *Molecules.*– 2017.– 26;22(8). –1255. doi: 10.3390/molecules22081255.
7. Нурушев М.Ж., Стоянова Л.Г., Бекеева С.А., Нурушева Г.М., Сулейменова Г.Р. О проекте создания природного консерванта пищевых продуктов на основе бактериоцинов молочнокислых бактерий в Казахстане // *Вестник ЕНУ им. Л.Н. Гумилева.* – 2011. – № 4.– С.175–180.
8. Сульtimoва Т.Д., Захаров Е.В. Бактериоцины молочнокислых бактерий // *Вестник ВСГУТУ.*– 2016.– № 2.– С. 41–47.
9. Vuyst L, Leroy F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. // *J Mol Microbiol Biotechnol.*– 2007.–13(4).– P. 194-199. doi: 10.1159/000104752.
10. Антоненко М.В., Гугучкина Т.И., Гапоненко Ю.В., Абакумова А.А.

Теоретическое обоснование и разработка методики определения консервантов микробного происхождения в винодельческой продукции // Плодоводство и виноградарство Юга России.– 2015.– № 34(04).– С.143–152.

11. Букина Ю.А. Антибактериальные свойства и механизм бактерицидного действия наночастиц и ионов серебра / Ю.А. Букина, Е.А. Сергеева // Вестник Казанского технологического университета.– 2012.–15(14).– С. 170–172.

12. Заславская М.И., Махрова Т.В., Александрова Н.А., Игнатова Н.И., Белова И.В., Точилина А.Г., Соловьева И.В. Перспективы использования бактериоцинов нормальной микробиоты в антибактериальной терапии (обзор) // СТМ.–2019.– Т.11,№3.– С. 136–145.

13. Shin J.M., Gwak J.W., Kamarajan P., Fenno J.C., Rickard A.H., Kapila Y.L. Biomedical applications of nisin. // J Appl Microbiol.– 2016.–120(6).– P.1449–1465. doi:10.1111/jam.13033

14. Jenna-Claire Ellis, Reynolds P Ross, Colin Hill. Nisin Z and lacticin 3147 improve efficacy of antibiotics against clinically significant bacteria // Future Microbiol.– 2019.– 14(18).– P. 1573–1587. doi.org/10.2217/fmb-2019-0153.

15. Зиновьев Е.В. Об эффективности местного применения гидрогелей карбополов при лечении синдрома диабетической стопы / Е.В. Зиновьев, Г.К. Ивахнюк, Т.О. Лагвилава // Вестник Российской военно-медицинской академии.– 2012.– 4(40) – С.200–205.

16. Arion, H. Carboxymethylcellulose hydrogel-filled breast implants. Our experience in 15 years / H. Arion // Ann. Chir. Plast. Esthet. 2001.– Vol. 46, № 1.– P. 55–59.

17. Вербицкий, Д.А. Применение геля карбоксиметилцеллюлозы для профилактики спайкообразования в брюшной полости: дис. . канд. мед. наук / Д.А. Вербицкий. СПб, 2004. – 178 с.

18. Esen S. Prevalence of nosocomial infections at intensive care units in Turkey: a multicentre 1-day point prevalence study. / Saban Esen, Hakan Leblebicioglu // Scand. J. Infect. Dis.– 2004.– 36(2).– P.144–148.

19. Intensive care antimicrobial resistance epidemiology (ICARE) surveillance report, data summary from January 1996 through December 1997: a report from the National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System. // *Am. J. Infect. Control.*– 1999.– 27.– P. 279–284.

20. Richards M.J. Gaynes Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. / M.J. Richards, J.R. Edwards, D.H. Culver, R.P. // *Crit Care Med.*– 1999.– 27(5).– P. 887–892.

21. Яковлев С.В. Антибиотикорезистентность в стационаре: контролируем ли мы ситуацию? / С.В. Яковлев, Д.Н. Проценко, Т. В.Шахова [и др.] // *Антибиотики и химиотерапия.*– 2010.– 55(1-2).– С. 50–58.

22. Gurusamy K.S. Antibiotic therapy for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in surgical wounds. / Gurusamy K.S., Koti R., Toon C.D. [et al] // *Cochrane Database Syst Rev.*, 2013. №8.– CD009726. Published 2013 Aug 20. doi:10.1002/14651858.CD009726.pub2

23. Dowset, C. The management of surgical wounds in a community setting // *Br. J. Community Nurs.* – 2002. – № 7. – P. 33–38.

24. Суфрияров Р.С. Лечение ассоциированных гнойных ран цитробактерно-стафилококковой природы / Р.С. Суфрияров, З.Г. Габидуллин, Р.Р. Суфрияров [и др.] // *Вестник ЮУрГУ*– 2011/– № 26– С.108–111.

25. Opal S.M., Medeiros A.A. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. / Opal S.M., Medeiros A.A. // *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone.– 2004.– P. 253–270.

26. Страчунский Л.С. β -лактамазы расширенного спектра – быстро растущая и плохо осознаваемая угроза. // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.*– 2005.– Том 7, № 1, С.92–96.

27. Сухорукова М.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011–2012 гг.

/ Сухорукова М.В., Склеенова Е.Ю., Иванчик Н.В. [и др.] //Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.– 2014.– 16(4).– С. 280-286.

28. Loewen K. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection: Literature review and clinical update./ Loewen K., Schreiber Y., Kirlew M. [et al] // Can Fam Physician, 2017, 63(7): P.512-520.

29. Шляпников С.А. Антибиотикорезистентность основных проблемных микроорганизмов отделения реанимации и интенсивной терапии хирургического профиля / С.А. Шляпников, Н.Р. Насер, Л.Н. Попенко, Н.В. Минаева // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН.– 2008.– № 3. – С. 178–179.

30. Чадаев, А.П. Гнойные заболевания пальцев и кисти / А.П. Чадаев, А.Ц. Буткевич, Г.Г. Савзян. – М.: Геликон, 1996. – 148 с.

31. Блатун, Л.А. Флегмоны и абсцессы: современные возможности лечения // Лечащий врач. – 2002. – № 1–2. – С. 30–40.

32. Бесчастнов В.В. Новый способ активного лечения гнойных ран мягких тканей. / В.В. Бесчастнов, В. Н.Марамохин //Известия высших учебных заведений.– 2010.– № 3 (15).– С. 59–67.

33. Жарова Л. В. Характеристика видового состава и антибиотико-чувствительность возбудителей раневой инфекции в разных отделениях хирургического профиля / Л. В. Жарова, С. В. Андреева, Л. И. Бахарева, Е. Р. [и др.] // Вестник Челябинского государственного университета. Биология.– 3.– 2015.– № 21 (376).– С. 59–64.

34. Фролова А.В. Раневая инфекция. Состояние проблемы./ А.В. Фролова, А.Н. Косинец, В.К. Окулич. // Вестник ВГМУ. Микробиология.– 2014.– Т.13, №2.– С.62–69.

35. Бесчастнов В.В. Результаты микробиологического мониторинга лечения гнойных ран в условиях общехирургического стационара / В.В. Бесчастнов, А.А. Певнев, Н.И. Малахова, А.Е. Московская. // СТМ.– 2009.– № 2.– С. 53-56.

36. Страчунский Л.С. Современная антимикробная химиотерапия.

Руководство для врачей. / Л.С. Страчунский, С.Н. Козлов.– М.: Боргес, 2002.– 432 с.

37. Родин А.В. Топическое применение антибиотиков в лечении раневой инфекции на примере неомицина. / А.В. Родин, Н.В. Даниленков, В.В. Привольнев. // Стационарозамещающие технологии: Амбулаторная хирургия.– 2018.– 3–4 (71–72).– С.42–50.

38. Блатун Л.А. Банеоцин® (порошок, мазь) – перспективы использования в комплексном хирургическом лечении гнойно-некротических поражений нижних конечностей у больных с синдромом диабетической стопы. // Раны и раневые инфекции.– 2015.– 2(3).– С.36–45.

39. Голуб А.В. Местная антибактериальная терапия хирургических инфекций кожи и мягких тканей в амбулаторных условиях: слагаемые успеха / А.В. Голуб, В.В. Привольнев // Раны и раневые инфекции. – 2014. – № 1. – С. 33–39.

40. Привольнев В.В. Местное лечение ран и раневой инфекции по результатам анонимного анкетирования хирургов России / В.В. Привольнев, Ю.С. Пасхалова, А.В. Родин // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2016. – Т. 18, № 2. – С. 152-158.

41. Frank D.N. Microbial diversity in chronic open wounds / D.N. Frank, A. Wysocki, D.D. Specht-Glick // Wound Repair Regen. – 2009. – 17. – P. 163–172.

42. Norman G. Antibiotics and antiseptics for surgical wounds healing by secondary intention / G. Norman, J. Dumville, D. Mohapatra, G. Owens [et al] // Cochrane Database Syst. Rev. – 2016. – 3. – CD011712.

43. Привольнев В.В. Местное лечение раневой инфекции: антисептики или антибиотики? / В.В. Привольнев, Н.А. Зубарева, Е.В. Каракулина // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2017. – Т. 19, № 2. – С. 131-138.

44. Голуб А.В. Местная антибактериальная терапия хирургических инфекций кожи и мягких тканей в амбулаторных условиях: слагаемые успеха. / А.В. Голуб, В.В. Привольнев // Раны и раневые инфекции. – 2014.–

1(1).– С. 33-39.

45. Блатун Л.А. Современные йодофоры – эффективные препараты для профилактики и лечения инфекционных осложнений. // *Consilium medicum.*– 2005.– 7(1).– 6–12.

46. Привольнев В.В. Препараты серебра в местном лечении инфицированных ран. / В.В. Привольнев, В.С. Забросаев, Н.В. Даниленков // *Вестник Смоленской государственной медицинской академии.*– 2015.–14(3).–С.85–91.

47. Prasetyo R Heru. Topical honey to treat an abscess caused by staphylococcus aureus: a case report / R Heru Prasetyo, Erma Safitri // *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.*– 2018.– 49(5).– P.835–838.

48. R. White. The benefits of honey in wound management // *Journal of wound care.*– 2016.– V. 25, N 9.– P.539–543.

49. P.C Molan. The evidence supporting the use of honey as a wound dressing // *Int J Low Extrem Wounds.*–2006.– 5(1).– P.40–54.

50. Привольнев В.В. Сравнительная активность препаратов мёда и нативного мёда в отношении штаммов с экстремальными фенотипами устойчивости к антимикробным препаратам. / В.В. Привольнев, М.В. Эйдельштейн, М.В. Сухорукова [и др.] // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.*– 2016.–18(1).– С.49–55.

51. Привольнев В.В. Мёд в лечении инфицированных ран. / В.В. Привольнев, Н.В. Даниленков // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.*– 2014.– 16(3).– С.219-228.

52. Ostorhazi E. In vivo activity of optimized apidaecin and oncocin peptides against a multiresistant, KPC producing *Klebsiella pneumoniae* strain. / E. Ostorhazi, É. Nemes-Nikodem, D. Knappe, R. Hoffmann. // *Protein Pept Lett.*– 2014.– 21(4).– P.368–373.

53. Ronald A. Sherman. Maggot Therapy Takes Us Back to the Future of Wound Care: New and Improved Maggot Therapy for the 21st Century // *Journal of Diabetes Science and Technology.*– 2009.– Volume 3, Issue 2.– P.336–344.

54. Зиновьев Е.В. Экспериментальная оценка эффективности ранозаживляющих средств при лечении ран, причиненных укусами собак. / Е.В. Зиновьев, Д.В.Костяков, А.А. Цветкова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5.– С.250–258.

55. Leaper D. Economic and clinical contributions of an antimicrobial barrier dressings: a strategy for the reduction of surgical sit infections / David Leaper, Jameel Nazir, Chris Roberts, Richard Searle // J. Med. Economics. –2010. – Vol. 13 (3). – P. 447 – 452.

56 Klaine S.J. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects / S.J. Klaine, P.J.J. Alvarez, G.E. Batley [et al] // Env. Toxicol. and Chemistry.– 2008. – Vol. 27.– № 9. – P. 1825 –1851.

57. Артемова А.Серебро исцеляющее и омолаживающее / Артемова А.– СПб.: Диля Паблишинг, 2001.– 137 с.

58. Maxwell Murphy. Current development of silver nanoparticle preparation, investigation, and application in the field of medicine / Maxwell Murphy, Kang Ting, Xinli Zhang [et al] // Journal of Nanomaterials.– 2015.– May.– P.1–12.

59. Atiyeh B.S. Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. / B.S. Atiyeh, M. Costagliola, S.N. Hayek, S.A. Dibo // Burns.– 2007.– v. 33, №. 2.– P. 139–148.

60. Каннер Е.В. Современные подходы к терапии острого ринофарингита у детей. / Е.В. Каннер, Д.В. Усенко, М.Л. Максимов, Е.А. Горелова // Рус. мед. журн.– 2014.– 21.– С.1541–1543

61. Дербенева М.Л. Препараты серебра в лечении воспалительных заболеваний носа / М.Л. Дербенева, А.Л. Гусева // Медицинский Совет.– 2015.– С. 20–22.

62. Batarseh K.I. Anomaly and correlation of killing in the therapeutic properties of silver (I) chelation with glutamic and tartaric acids. // J. Antimicrob. Chemother.– 2004.– 54(2).– P. 546–548.

63. Wells T.N. Mechanism of irreversible inactivation of phosphomannose isomerases by silver ions and flomazine. / T.N. Wells, P. Scully, G. Paravicini [et al] // *Biochemistry*.– 1995.– 34(24).– P. 7896–7903

64. К вопросу о металлизации ДНК в растворе / Н.А. Касьяненко, М.С. Варшавский, Чжан Цюши, Г.В. Алексеев, В.М. Бакулев. // *Вестник СПбГУ*.– 2014.– 1(59).– С. 498–507.

65. Ma S. Effect of refluxed silver nanoparticles on inhibition and enhancement of enzymatic activity of glucose oxidase / Shiyu Ma, Jin Mu, Yi Qu, Long Jiang. // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*.– 2009.– 345(1–3).– P.101–105.

66. Mukha Iu.P. Antimicrobial activity of stable silver nanoparticles of a certain size. / Iu.P. Mukha, A.M. Eremenko, N.P. Smirnova [et al] // *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*– 2013.– 49.– P 215–223.

67. Pokrowiecki R. Evaluation of biocidal properties of silver nanoparticles against cariogenic bacteria. / R. Pokrowiecki, T. Zareba, A. Mielczarek [et al] // *Med. Dosw. Mikrobiol.*– 2013.– 65.– P. 197–206.

68. Priester J.H. Integrated approach to evaluating the toxicity of novel cysteine-capped silver nanoparticles to *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. / J.H. Priester, A. Singhal, B.Wu [et al] // *Analyst*.– 2014.– 139.– P. 954–963.

69. Chernousova S. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. / S. Chernousova, M. Epple // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*– 2013.– 52.– P.1636–1653.

70. Jin X. High-throughput screening of silver nanoparticle stability and bacterial inactivation in aquatic media: influence of specific ions. / X. Jin, M. Li, J. Wang [et al] // *Environ Sci. Technol.*– 2010.– 44.– P. 7321–7328.

71. Musee N. The antibacterial effects of engineered nanomaterials: implications for wastewater treatment plants. / N. Musee, M. Thwala, N. Nota // *J. Environ. Monit.*– 2011.– 13.– P.1164–1183.

72. Щербаков А.Б. Препараты серебра: вчера, сегодня, завтра. / А.Б.

Щербаков, Г.И. Корчак, Е.В. Сурмашева [и др.] // Фармацевтический журнал. – 2006. – 5. – С. 45–57.

73. Максименя Г.Г. Клинико-фармакологическая характеристика препаратов для обработки ран. // Военная медицина.– 2014.– 2.– С.105–114.

74. Alt V. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement / V. Alt, T. Bechert, P. Steinrücke. // Biomaterials. – 2004. – 25. – P. 4383–4391.

75. Jung J.H. Metal nanoparticle generation using a small ceramic heater with a local heating area / J.H. Jung, H.C. Oh, H.S. Noh. // J. Aerosol. Sci. – 2006. – N37. – P.1662–1670.

76. Kim K.J. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans* / K.J. Kim, W.S. Sung, B.K. Suh // Biometals. – 2009. – N22. – P.235–242.

77. Абаева Л.Ф. Наночастицы и нанотехнологии в медицине сегодня и завтра. / Л.Ф. Абаева, В.И. Шумский, Е.Н. Петрицкая [и др.] // Альманах клинической медицины.–2010.– 22– С. 10–16.

78. Lewinski N., Colvin V., Drezek R. Cytotoxicity of Nanoparticles / N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek. // Small J.– 2008.–V.4, No.1.– P.26–49.

79. Н.С. Леоненко. Сравнительный анализ токсичности и опасности химических соединений различной размерности (обзор литературы) // Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки.– 2016.– 2– С.48–67

80. Ji J. H. Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats / J.H. Ji // Inhalation Toxicology.–2007.– 19 (10).– P. 857–871.

81. Singh M. Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles. / M. Singh, S. Singh, S. Prasad, I.S. Gambhir. // Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures.– 2008.–3(3).– P.115–122.

82. Shrivastava S. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. / S. Shrivastava, T. Bera, A/ Roy [et al.] // Nanotechnology.–

2007.–18 (22).– P.1–9.

83. Morones J.R. The bactericidal effect of silver nanoparticles. / J.R. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Camacho [et al.] // *Nanotechnology*.– 2005.– 16(10).– P.2346–2353.

84. Красочко П.А. Противовирусные свойства препарата на основе наночастиц серебра / П.А. Красочко, И.А. Красочко, А.Э. Станкуть, С.А. Чижик // *Ветеринарная медицина*.– 2013.– 97.– С. 526–528.

85. Opal S.M., Medeiros A.A. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. In: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R., editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2004. p. 253–270.

86. Абаева Л.Ф., Шумский В.И., Петрицкая Е.Н., Рогаткин Д.А., Любченко ПН. Наночастицы и нанотехнологии в медицине сегодня и завтра. // *Альманах клинической медицины*.–2010.– 22: С. 10–16.

87. Lewinski N., Colvin V., Drezek R. Cytotoxicity of Nanoparticles // *Small J*. 2008. V.4, No.1. P.26-49.

88. Н.С. Леоненко. Сравнительный анализ токсичности и опасности химических соединений различной размерности (обзор литературы) // *Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки*.– 2016.– 2– С.48–67

89. Paul D. Cotter, R. Paul Ross, Colin Hill. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics?. // *Nat Rev Micro*. – 2012.– #11.– P.95–105.

90. Sumanpreet Kaur, Sukhraj Kaur. Bacteriocins as Potential Anticancer Agents. // *Front. Pharmacol*.– 2015. – #6.– P.1–11.

91. Luc De Vuyst, Frederic Leroy. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. // *J Mol Microbiol Biotechnol*.– 2007.– #13.– P.194–199.

92. Minah C.J., Morero R.D. Inhibition of enterocin CRL35 antibiotic activity by mono- and divalent ions // *Lett. Appl. Microbiol*. – 2003. – Vol. 37, # 5. – P. 374-379.

93. De Vuyst L., Leroy F Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications // *Mol. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 13. – P. 194–199.

94. Oscariz J.C., Pissabarro A.G. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by grampositive bacteria // *Int. Microbiol.* – 2011. – #18. – P. 13–19.

95. Bittencourt E., Suzart S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil // *J. Med. Microbiol.* – 2004. – Vol. 53. – P. 1069–1073.

96. Абатуров А.Е. Крючка Т.А. Потенциальное значение бактериоцинов при этиологическом лечении инфекционных заболеваний респираторного тракта // *Здоров'я дитини.* – 2017. – Т. 12, № 7. – С.124–131.

97. Л.Г. Стоянова, Е.А. Устюгова, А. И. Нетрусов. Антимикробные метаболиты молочнокислых бактерий: разнообразие и свойства (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 2012. – Т 48, № 3. – С. 259–275.

98. Alvarez-Sieiro P. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family / P. Alvarez-Sieiro, M. Montalbán-López, D. Mu, O.P. Kuipers // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2016. – 100(7). – P. 2939-2951. – doi: 10.1007/s00253-016-7343-9.

99. Bastos Mdo C., Coelho M.L., Santos O.C. Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria // *Microbiology.* – 2015. – 161(Pt. 4). – 683–700. – doi: 10.1099/mic.0.082289-0.

100. Кудряшов В.Л., Алексеев В.В., Фурсова Н.А. Низин и натамицин – эффективные пищевые микробиологические консерванты // *Пищевая индустрия.* – 2020. – №2(44). – С. 67–71.

101. Бисенова Г.Н., Сармурзина З.С., Алмагамбетов К.Х., Торина А.К., Борибаева А.Ж. Изучение бактериоцин-продуцирующей активности изолятов и коллекционных культур молочнокислых бактерий // *Новости науки Казахстана.* – 2016. – №1(127). – С.86–98.

102. Cotter Paul D, Hill Colin, Ross Paul R. Bacteriocins: developing innate

immunity for food. // *Nature Reviews Microbiology*.– 2005.–3.– P. 777–788.

103. Surugau L.N. Peptide separation by capillary electrophoresis with ultraviolet detection: some simple approaches to enhance detection sensitivity and resolution // *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*. – 2011. – Vol. 15 (2). – P. 273-287.

104. Стоянова Л.Г. Выделение и идентификация молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* с антимикробным действием // *Известия ТСХА*.– 2017.– № 5.– С.41–61. DOI 10.26897/0021-342X-2017-5-41-61

105. Mills S., Ross R.P., Hill C. Bacteriocins and bacteriophage; a narrow-minded approach to food and gut microbiology. // *FEMS Microbiol Rev*.– 2017.– 41.– P. 129–S153. doi: 10.1093/femsre/fux022.

106. Андрюков Б.Г., Недашковская Е.П. Вступая в пост-антибиотиковую эру: перспективные стратегии поиска новых альтернативных стратегий борьбы с инфекционными заболеваниями // *Здоровье. Медицинская экология. Наука*.– 2018.– 3 (75) – С. 36–50.

107. Angelopoulou A, Field D, Pérez-Ibarreche M, Warda AK, Hill C, Ross RP. Vancomycin and nisin A are effective against biofilms of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* isolates from human milk. // *PLoS One*.– 2020.– 15(5).–P. 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0233284

108. De Kwaadsteniet M, Doeschate KT, Dicks LM. Nisin F in the treatment of respiratory tract infections caused by *Staphylococcus aureus*. // *Lett Appl Microbiol*.– 2009.– 48(1).– P.65–70. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02488.x.

109. Maurício Elisabete, Rosado Catarina, Duarte Maria Paula, Verissimo Joana, Bom Sara, Vasconcelos Laura. Efficiency of Nisin as preservative in cosmetics and topical products. // *Cosmetics*.– 2017.– 4(41).– P. 1–11. doi:10.3390/cosmetics4040041.

110. Стоянова Л.Г., Габриэлян Н.И., Крупенио Т.В., Шарапченко С.О. Антагонистическое взаимодействие штаммов *Lactococcus Lactis* ssp. *Lactis* и *Klebsiella pneumoniae* // *Медицинский алфавит*.– 2017. – № 38, Т 4. – С. 18–24.

111. Вальшев А.В., Вальшева Н.А. Комбинация антибиотиков и бактериоцинов – эффективный способ борьбы с резистентными микроорганизмами // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН.– 2016.– №4.– С. 1–6.

112. Naghmouchi K., Belguesmia Y., Baah J., Teather R., Drider D. Antibacterial activity of class I and IIa bacteriocins combined with polymyxin E against resistant variants of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. Res. Microbiol. 2011. 162 (2): 99-

113. Перцев І.М. Конструювання лікарських систем багатоспрямованої дії у вигляді мазей для лікування інфікованих ран / І.М. Перцев, Б.М. Даценко, В.Г. Гунько [и др.] // Вісн. фармації.– 1994.– 1(2).– С 91–95.

114. Теория и практика местного лечения гнойных ран (проблемы лекарственной терапии) / Под ред. проф. Б.М. Даценко.– К: Здоров'я, 1995.– 384 с.

115. Перцев И.М. Значение осмотических мазей при их использовании в медицинской практике / И.М. Перцев, Н.Н. Беркало, С.А. Гуторов, В.В. Постольник. // Вісник фармації.– 2002.– 2(30).– С. 7–10.

116. Раны и раневая инфекция /Под ред. акад. АМН СССР проф. М.И. Кузина и проф. Б.М. Костюченко – М.: Медицина, 1990.– С. 223–297.

117. Wnek G.E. Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering, vol. 1./ Wnek G.E., Bowlin G.L.– New York, Marcel Dekker, 2008.– 448 p.

118. Хайтметова С.Б. Синтез и изучение свойств полимерных комплексов этацизина с карбоксиметилцеллюлозой / С.Б. Хайтметова, Ш.А. Шомуротов, А.С. Тураев // Химия растительного сырья. – 2017. – №4. – С. 23–30.

119. Chandra W.P. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. / W.P. Chandra , P. Sharma // Trends Biomater. Artif. Organs.–2004.– 18(1).– P. 18–23.

120. Chiu T. «Xenograft» dressing in the treatment of burns. / T. Chiu, A. Burd // Clin Dermatol.– 2005.– 23(4).– P. 419–423.

121. Harish Prashanth K.V. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. / K.V. Harish Prashanth, R.N. Tharanathan // Trends in Food Science&Technology.– 2007.– 18.– P.117–131.

122. Harsha Kharkwal. Biodegradable polymers, role in enhancing bioavailability of drug. / Harsha Kharkwal, Kumud Bala, Deepshikha Pande Katare. // Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences.– 2011.– 1(5).– P.1–11.

123. Загурская М.С. Применение мазей для местного лечения воспалительных процессов / М.С. Загурская, П.А. Затолока. // Медицинский журнал.– 2016.– 2(56).– С. 135–137.

124. Мурадян Р.Г. Современные методы местного лечения ран, стимулирующие репаративные процессы (экспериментально-клиническое исследование): автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Р. Г. Мурадян.– М., 1996.– 37 с.

125. Соколова-Меркурьева А.В. Разработка состава и технологии мази антимикробного действия / А.В. Соколова-Меркурьева, А.В. Пантюхин, А.А. Архангельская, Д.В. Силаев // Международный научно-исследовательский журнал.– 2017.– 9(63).– С. 50–53.

126. Шикова Ю.В. Сравнительное изучение реологических свойств мази на эмульсионной и гелевой основах / Ю.В. Шикова, В.А. Лиходед, А.И. Булгакова [и др.] // Медицинский альманах.– 2013.– 2(26).– С. 194–196.

127. Горбацевич Г.И. Биофармацевтические аспекты технологии ранозаживляющих гелей, содержащих комплекс серебра(I) с 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил) уксусной кислотой. / Г.И. Горбацевич, С.И. Стахевич, Н.В. Логинова [и др.] // Журнал Белорусского государственного университета. Химия.– 2019.– 2.– С. 29–39.

128. Горбацевич Г.И. Стабилизация комплекса серебра(I) с 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил) уксусной кислотой в антимикробной лекарственной форме. / Г.И. Горбацевич, С.И. Стахевич, Н.В. Логинова [и др.] // Журнал Белорусского государственного университета. Химия.– 2017.– 2.– С. 59–67.

129. Smit H. The revival of interest in mechanisms of bacterial pathogenicity // *Biol. Rev.*–1995.– 70(2).– P. 277–316.

130. Алексеева И.В. Разработка лекарственных форм для лечения ран // *Фармация.*– 2003.– 2.– С. 43–45.

131. Огай М.А. Использование полимерных основ в мазях для лечения и профилактики патологии «Диабетическая стопа». / М.А. Огай, Э.Ф. Степанова, В.Ф. Дзюба, Е.В. Морозова // *Научные ведомости. БелГУ, Серия Медицина. Фармация.* – 2010.– № 22 (93), Вып. 12/2. – С. 5-9.

132. Kulikowska A. Synthesis of carboxymethylcellulose nanoparticles using various coiling agents. / A. Kulikowska, I. Wasiak, T. Ciach T. // *Prosimy cytować jako: Inż. Ap. Chem.* –2014.– 53(4).– P. 268–269.

133. Rahman Au.R. *Frontiers in stem cell and regenerative medicine research*, vol. 8. / Au.R. Rahman, S. Anjum.– Sharjah, UAE: S. Bentham Science Publishers, 2018.– 178 p.

134. Горохова А.С. Применение иммобилизованной формы бензалкония хлорида и метронидазола в лечении гнойных ран / А.С. Горохова, А.Ю. Григорьян, А.И. Бежин [и др.] // *Бюллетень сибирской медицины.*– 2017.– 16(3).– С.43–51.

135. Ахмед И.М. Разработка составов, технологии и исследование мазей с эритромицина эстолатом для лечения местных гнойно-воспалительных процессов: дисс. на соиск. канд. фарм. наук; Курск, 2003, Специальность: 15.00.01: 135 с.

136. Кухтенко Г.П., Попова Т.В., Гладух Е.В., Кухтенко А.С. Сравнительный анализ карбомерных полимеров для фармацевтической и косметической практики // *Запорожский медицинский журнал.*– 2020.– Т 22, № 3 (120), С. 431–436.

137. Вујар Муса, Зирко Алла, Демин Михаил. Полимеры Carbopol[™] в качестве функциональных гелеобразователей // *Фармацевтическая отрасль.*– 2018.– № 1 (66).– С. 110–113.

138. Зирко Алла, Демин Михаил. Применение полимеров Carbopol[®] в

качестве стабилизаторов для приготовления суспензии // Фармацевтическая отрасль.– 2020.– № 1(78).– С. 35–37.

139. Сапожкова М.Б., Калмыкова Т.П., Суслина С.Н. Разработка технологии получения противоварикозного геля // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – Т. 46, № 5. – С. 35-38.

140. Семкина О.А., Суслина С.Н. Краснюк И.И. Обоснование состава геля Эвкалимина на основе сравнительного изучения реологических параметров редкосшитых акриловых полимеров // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия «Медицина». Специальность «Фармация». – 2004. – № 4 (28). – С. 216–222.

141. Pelot D.D., Klep N., Yarin A.L. Spreading of Carbopol gels // Rheol Acta.– 2016.– V.55., Is.4.– P. 279-291. doi: 10.1007/s00397-016-0920-0.

142. Фазлиев С.А., Бобоев З.Д., Аминов С.Н. Получение геля «Лагоден» и изучение его физико-химических свойств // Медицинское наследие Авиценны и актуальные проблемы медицины: тез. докл. Междунар. науч. конф. Бухара.– 2015.– С. 115.

143. Семкина О.А., Джавахян М.А., Левчук Т.А., Охотникова В.Ф. Вспомогательные вещества, используемые в технологии мягких лекарственных форм (мазей, гелей, линиментов, кремов) // Химико-фармацевтический журнал. – 2005. – Т. 39. – № 9. – С. 45–48.

144. Локарев А.В., Огай М.А., Степанова Э.Ф., Морозов Ю.А., Нам Н.Л., Сливкин А.И., Беленова А.С. Разработка мягкой лекарственной формы с коллагеназой камчатского краба и перспективы ее применения // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация.– 2020.– № 2.– С. 115–122.

145. Фазлиев С.А., Аминов С.Н. Технология получения гемостатического геля «Лагоден» на основе карбопола // Фармация и фармакология.– 2016.–Т.4, № 6.– С.44–53.

146. Романко Т.В., Аюпова Г.В., Федотова А.А., Ю.И. Муринов Ю.И., Романко В.Г. Оптимизация реологических свойств адсорбционного вагинального геля на основе карбомера // Башкирский химический журнал.– 2008.–

Том 15. № 4.– С. 85–89.

147. Грих В.В. Разработка лекарственных форм нифедипина с применением твердых дисперсий: дисс. на соиск. канд. фарм. наук; Москва, 2018, Специальность: 14.04.01: 151 с.

148. Гладух Е.В., Грубник И.М., Кухтенко Г.П. Влияние солубилизатора ПЭГ-40 гидрогенизированное касторовое масло на структурно-механические свойства гелей карбопола // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2017. – Т. 10, №3(25).– С. 288–285.

149. Семкина О.А., Смирнова И.П., Джавахян М.А., Бондаренко О.В., Кишмахова Л.М. Разработка состава и технологии геля ранозаживляющего действия // Вестник РУДН, серия Медицина.– 2013.– № 4.– С. 79–87.

150. Жилина И.В., Степанова Э.Ф., Голова Г.А. Разработка состава и технология геля с экстрактом из цветков лабазника вязолистного для использования в качестве дерматопротектора. // Фундаментальные исследования.– 2011.– №9.– С. 349–351.

151. Сапожкова М.Б., Калмыкова Т.П., Суслина С.Н. Разработка технологии получения противоварикозного геля // Химико-фармацевтический журнал.– 2012.– 46(5).– С. 35–38.

152. Хаджиева З.Д., Чумакова В.А. Выбор оптимального состава геля фексофенадина противоаллергического действия. // Фармация и фармакология.– 2015.– № 3 (10).– С. 57–60.

153. Семина И.И., Буховец А.В., Протасова А.А., Ситенков А.Ю., Гарипова В.Р., Макарова Е.А., Муаафин Р.И. Изучение безвредности применения инновационных пероральных систем доставки лекарственных веществ на основе интерполиэлектролитных комплексов с использованием полимеров фармацевтического назначения Carbopol® и Euragit® // Фундаментальные исследования.– 2014.– № 12(5).– С. 982–986/

154. Кулешова С.И. Определение активности антибиотиков методом диффузии в агар // Ведомости НЦЭСМП.– 2015.– № 3.– С. 13–17.

155. Волянський Ю.Л. Методичні рекомендації по вивченню специ-

фічної активності протимікробних лікарських засобів / Ю.Л. Волянський, І.С. Грищенко, В.Н. Ширококов та ін.– К.: 2004.– С.21–22.

156. Mishyna M.M., Burov A.N., Vekshyn V.A., Grabovetskaya E.R. Evaluation of antimicrobial activity of some compounds for purulent wounds treatment. // Journal of Education Health and Sport. – 2021.–11(03).– P. 34–41.

157. Mishyna M.M., Burov A.N., Vekshyn V.A., Grabovetskaya E.R. Antibacterial effect of nisin in vitro. // Journal of Education Health and Sport. – 2020.–12(10).– P. 332–338.

158. Тихонов А.И. Технология лекарств / А.И. Тихонов, Т.Г. Ярных.– Харьков: НФАУ «Золотые страницы», 2002.– 704 с.

159. Блатун Л.А. Клинико-лабораторная эффективность современных мазей на полиэтиленгликолевой основе при лечении гнойных ран / Л.А. Блатун, А.М. Светухин, А.А. Пальцин [и др.] // Антибиотики и химиотерапия.–1999.–7.– С. 25–31.

160. Чижова Е.Т., Михайлова Г.В. Медицинские и лечебно-косметические мази. / Е.Т. Чижова, Г.В. Михайлова. – М.: ВУНМЦ, 1999. – 404 с

161. Семкина О.А. Вспомогательные вещества используемые в технологии мягких лекарственных форм (мазей, гелей, линиментов, кремов) (обзор) / О.А. Семкина, М.А. Джавахян, Т.А. Левчук [и др.] // Химико-фармацевтический журнал.– 2005.–39(9).– С. 45–48.

162. Kulikowska A., Wasiak I., Ciach T. Synthesis of carboxymethyl-cellulose nanoparticles using various coiling agents. Prosimy cytować jako: Inż. Ar. Chem. 2014; 53(4): 268–269.

163. Harsha Kharkwal, Kumud Bala, Deepshikha Pande Katare. Biodegradable Polymers, Role in Enhancing Bioavailability of Drug. Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences. 2011; 1 (5): 1–11.

164. Vinklárková L., Masteiková R., Vetchý D., Doležel P., Jurga Bernatonié J. Formulation of Novel Layered Sodium Carboxymethylcellulose Film Wound Dressings with Ibuprofen for Alleviating Wound Pain. BioMed Research International. 2015; 1–11.

165. Popa V., Volf I. Biomass as Renewable Raw Material to Obtain Bioproducts of High-Tech Value, Elsevier, 2018: 401.

166. Tanaka A., Furubayashi T., Matsushita A. et al. Nasal Absorption of Macromolecules from Powder Formulations and Effects of Sodium Carboxymethyl Cellulose on Their Absorption. PLOS ONE. 2016; 6: 2–11.

167. Kamel S., Ali N., Jahangir K., Shah S.M., El-Gendy A.A. Pharmaceutical significance of cellulose: A review. eXPRESS Polymer Letters. 2008; 2 (11): 758–778.

168. Mali K.K., Dhawale S.C., Dias R.J., Dhane N.S., Ghorpade V.S. Citric Acid Crosslinked Carboxymethyl Cellulose-based Composite Hydrogel Films for Drug Delivery. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2018; July-August: 657–667.

169. Е.Т. Жиликова, Н.Н. Попов, М.Ю. Новикова, О.О. Новиков, Д.А. Фадеева. Изучение физико-химических и технологических характеристик комбинированного пролонгатора натрий карбоксиметилцеллюлозы и поливинилового спирта с целью создания пролонгированных лекарственных форм с жидкой дисперсионной средой. // Научные ведомости. Серия Медицина. Фармация. – 2011.– № 22 (117), Вып. 16/2. – С. 69-79.

170. Bishop S.M., Walker M., Rogers A.A. et al. Importance of moisture balance at the wound-dressing interface. J. Wound Care. 2003; 12(4): 125–128.

171. Leszek A.D., Biomaterials in Regenerative Medicine, Books on Demand, 2018: 290.

172. Ghorpade V., Mali K., Dias R. Karande P. Carbopol and Sodium Carboxymethylcellulose Based Methylsulfonylmethane Gels for Treatment of Osteoarthritis: In-vitro and In-vivo Evaluation. Ind J Pharm Edu Res. 2012; 46(3): 235–242.

173. Р.Ф. Морозова, Л.В. Спатлова Изучение структурной вязкости геля на примере лекарственного препарата «Гепарин» // Инновационная наука. – 2018.– №5-1.– С.38-41.

174. Mahdavinia G., Afzali A., Etemadi H., Hosseinzadeh H. Magnetic/pH-sensitive nanocomposite hydrogel based carboxymethyl cellulose-g-polyacrylamide/montmorillonite for colon targeted drug deliver. *Nanomed Res J.* 2017; 2(2): 111–122.

175. Ornanong S. Kittipongpatana, Siriporn Burapadaja, Nisit Kittipongpatana. Development of Pharmaceutical Gel Base Containing Sodium Carboxymethyl Mungbean Starch. *CMU. J. Nat. Sci.* 2008; 7(1): 23–32.

176. Sannino A., Demitri C., Madaghiele M. Biodegradable Cellulose-based Hydrogels: Design and Applications. *Materials.* 2009; 2: 353–373.

177. Ткаченко А.М., Перцев И.М., Халеева Е.Л. Изучение структурно-механических свойств гелей «Троксерутин 2%» и «Эконазол 1%» // *Вісник фармації.*– 2002.– 2(30).– С.43–45.

178. Mishina M.M., Vekshin V.A., Burov A.N., Grabovetskaya E.R. Investigation of physico-chemical characteristics of carboxymethylcellulose colloidal carriers for medical preparations. // *Journal of Education, Health and Sport.* – 2021.– 11(1).– P.202-218. DOI <http://dx.doi.org/10.12775/JEHS.2021.11.1.020>.

179. Манухина Е.Б., Малышев И.Ю. Роль оксида азота в развитии и предупреждении дисфункции эндотелия // *Вестник ВГМУ.*– 2003.– Т.2, №2.– С. 5–17.

180. Макарова В.И., Макаров А.И. Роль цитокинов в реализации воспалительной реакции // *Экология человека.*– 2008.– №5.– С. 31–35.

181. Каштальян О.А., Ушакова Л.Ю. Цитокины как универсальная система регуляции // *Медицинские новости.*– 2017.– № 9.– С. 3–7.

182. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Лилли Р. – М.: Мир, 1960. – 648 с.

183. Пирс Э. Гистохимия (теоретическая и прикладная) / Пирс Э. – М.: Иностранная литература, 1962. – 962 с.