

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
"ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ім. І. І. МЕЧНИКОВА
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ"**

НЕВМЕРЖИЦЬКИЙ ВІТАЛІЙ ВАСИЛЬОВИЧ

УДК 579.61 + 615.28:615.32:615.45

**ПРОТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ НОВИХ МАЗЕВИХ КОМПОЗИЦІЙ
НА ОСНОВІ ЕКСТРАКТУ ХМЕЛЮ ВУГЛЕКИСЛОТНОГО**

03.00.07 - мікробіологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Харків – 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в лабораторії протимікробних засобів Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України».

Науковий керівник: кандидат медичних наук, старший науковий співробітник **Казмірчук Віктор Володимирович**, Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України», завідувач лабораторії протимікробних засобів

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор **Степанський Дмитро Олександрович**, Дніпровський державний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології;

доктор медичних наук, професор **Куцик Роман Володимирович**, Івано-Франківський національний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та імунології.

Захист дисертації відбудеться «29» вересня 2021 р. об 11.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01 Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» за адресою: 61057, м. Харків, вул. Пушкінська, 14-16.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» за адресою: 61057, м. Харків, вул. Пушкінська, 14-16.

Автореферат розісланий «27» серпня 2021 р.

Учений секретар
спеціалізованої Вченої ради Д 64.618.01
к. мед. н., с. н. с.



І. А. Воронкіна

Актуальність теми. Місцева терапія ранової інфекції залишається однією з актуальних проблем хірургії. Пацієнти хірургічного профілю з гнійно-запальними захворюваннями складають 35-45 %, післяопераційні гнійні ускладнення виникають у 24-30 % випадках. Летальність при хірургічній гнійній інфекції становить від 40 % до 60 %. У медичній практиці для лікування ран і профілактики ранових інфекцій застосовують протимікробні засоби переважно хімічної природи. Внаслідок цього в організмі людини пригнічується нормальна мікробіота, знижується імунологічний статус, зростає кількість алергічних реакцій та ускладнень перебігу захворювання. До того ж широке та нераціональне застосування антибіотиків призводить до утворення полірезистентних форм мікроорганізмів (Дронов А. И. та ін., 2013; Nisale S. S. et al., 2017).

Актуальним залишається пошук нових, високоефективних протимікробних засобів на основі рослинної сировини. Фітотерапія все активніше застосовується для лікування широкого спектру хвороб, у тому числі мікробного генезу. Перевагою використання в медичній практиці лікарських рослин і фітопрепаратів є їх мала токсичність та відсутність вираженої побічної дії. Аналіз клінічних показань для застосування певних фітопрепаратів свідчить про те, що більшість ліків рослинного походження використовуються у випадках хронічного перебігу хвороби із віддаленими ускладненнями, у тому числі – обумовленими тривалим застосуванням антибіотиків, хіміопрепаратів, антисептиків (Heinrich M. et al., 2017; Colalto C., 2018).

У низці робіт закордонних і вітчизняних науковців доведена антибактерійна та фунгіцидна дія ряду хмелепродуктів, у тому числі екстракту хмелю вуглекислотного (Сермак Р. et al., 2017; Восquet L. et al., 2018; Мінухін В. В., 2018; Проценко Л. В., 2019; Казмірчук В. В., 2020).

Найбільш зручною лікарською формою для місцевої терапії інфікованих ран є мазі, які легко наносяться на уражену ділянку шкіри, утворюючи захисну плівку діючої речовини, що дозволяє зберегти її оптимальну концентрацію та пролонгувати терапевтичний ефект препарату.

Вищезазначене обґрунтовує актуальність створення нової мазевої композиції на основі екстракту хмелю вуглекислотного (ЕХВ), для підвищення ефективності лікування інфікованих ран.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами. Дисертаційна робота виконана у відповідності з планом наукових досліджень Національної академії медичних наук України в Державній установі «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» у межах бюджетних НДР: «Експериментальне обґрунтування розробки лікарських засобів протимікробної дії з продуктами хмелю для профілактики і лікування запальних захворювань ротової порожнини» (номер держреєстрації 0114U000247); «Розробка протимікробного засобу з екстрактом хмелю для лікування *acne vulgaris*» (номер держреєстрації 0117U002280); «Розробка протимікробного засобу на основі хмелепродуктів для місцевого лікування інфікованих ран та опіків» (номер держреєстрації 0120U100720); в

яких дисертантом на референтних тест-штамах мікроорганізмів охарактеризовано протимікробну активність ЕХВ за показниками МІК, МБК та МФК; вивчено формування резистентності до дії зростаючих концентрацій ЕХВ у клінічних штамів мікроорганізмів; досліджено цитотоксичність ЕХВ; виконано дослідження з визначення спектру і рівнів протимікробної активності розроблених зразків мазевих композицій з ЕХВ та допоміжними речовинами.

Тему дисертації затверджено на засіданні Вченої ради Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» (прот. № 6 від 30.11.2013 р. – 03.12.2013 р.).

Мета і завдання дослідження. *Мета* - мікробіологічне обґрунтування розробки маzewої композиції на основі екстракту хмелю вуглекислотного для підвищення ефективності лікування інфікованих ран.

Для досягнення мети сформовано наступні *основні завдання*:

1. Вивчити протимікробну активність ЕХВ за показниками мінімальної інгібуючої, бактерицидної та фунгіцидної концентрації.
2. Визначити швидкість формування резистентності у збудників ранової інфекції до дії ЕХВ.
3. Дослідити цитотоксичну дію різних концентрацій ЕХВ на перещеплювані культури клітин людини.
4. Розробити серію нових мазевих композицій з ЕХВ та допоміжними речовинами.
5. Визначити чутливість референтних та клінічних штамів збудників ранової інфекції до дії експериментальних зразків мазевих композицій з ЕХВ та визначити найбільш перспективну.

Об'єкт дослідження – екстракт хмелю вуглекислотного, нові мазеві композиції на основі ЕХВ.

Предмет дослідження – антибактеріальна, фунгіцидна активність ЕХВ та нових мазевих композицій на його основі, швидкість формування резистентності у домінуючих різновидів ранової інфекції до ЕХВ.

Методи дослідження: мікробіологічні (методом двократних серійних розведень охарактеризовано протимікробну активність ЕХВ за показниками МІК, МБК та МФК на тест-штамах мікроорганізмів; методом послідовних багаторазових пасажів мікроорганізмів на поживних середовищах у субінгібуючих концентраціях вивчено швидкість формування резистентності до ЕХВ у домінуючих збудників ранової інфекції; методом «колодязів» визначено протимікробну дію експериментальних зразків мазевих композицій на основі ЕХВ та допоміжних речовин щодо музейних та клінічних ізолятів); цитологічні (визначено цитотоксичність ЕХВ на культурах перещеплюваних ліній епітеліальних клітин аденокарциноми гортані людини (Нер-2) і диплоїдних фібробластів людини (М-19) за показниками мінімальної токсичної концентрації (МТК у мг/мл), цитотоксичної концентрації, яка викликає загибель 50 % клітин (ЦК₅₀ у мг/мл) та індексу селективності (ІС); технологічні (виготовлення експериментальних зразків мазевих композицій на основі ЕХВ та допоміжних речовин), математико-статистичні (обробка отриманих

результатів експериментів за допомогою пакету прикладних програм Microsoft Excel 2016).

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше на референтних тест-штамах мікроорганізмів охарактеризовано протимікробну активність ЕХВ за показниками МІК, МБК та МФК, значення яких становило 1,69 - 4,15 мг/мл, 3,38 - 7,14 мг/мл та 8,53 мг/мл відповідно.

Вперше доведено повільне формування резистентності до дії зростаючих концентрацій ЕХВ у клінічних штамів *S. aureus* та *P. aeruginosa* із досягненням на 30 пасажі кінцевого рівня МІК (медіана) для *S. aureus* – 11,83 мг/мл і *P. aeruginosa* – 45,3 мг/мл.

Вперше отримані результати досліджень, в яких визначено цитотоксичність ЕХВ на лінійних культурах епітеліальних клітин (Нер-2) та фібробластів (М-19) людини, які показали низький рівень цитотоксичної дії ЕХВ на еукаріотичні клітини (ЦК₅₀ 28,7 і 77,3 мг/мл відповідно) та високу її селективність (ІС 17,0 - 45,7 для *S. aureus* ATCC 25923 і *P. aeruginosa* ATCC 27853 та 6,9 - 18,6 для *C. albicans* ATCC 885-653).

Вперше розроблено вісім експериментальних зразків (№№ 1-8) мазевих композицій з ЕХВ та допоміжними речовинами в різних концентраціях, які повністю відповідають чинним вимогам ДФУ 2 до м'яких лікарських форм.

За результатами мікробіологічного скринінгу на референтних тест-штамах мікроорганізмів встановлена найвища протимікробна активність зразку мазевої композиції № 8, яка містить (мас.%): ЕХВ - 5,0; пропіленгліколь – 10,0; емульгатор 1 – 5,0; ПЕО 1500 – 28,0; ПЕО 400 – 52,0.

Вперше доведено, що нова мацева композиція з ЕХВ № 8 перевершує препарат-аналог "Календули мазь" за протимікробною активністю стосовно клінічних ізолятів домінуючих видів збудників ранової інфекції: *A. baumannii*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *C. perfringens*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *P. vulgaris*, *B. subtilis*, *C. albicans* ($p < 0,05$).

Практичне значення отриманих результатів. Розроблено нову протимікробну композицію у формі мазі (що містить на 100 гр.: ЕХВ - 5,0; пропіленгліколь – 10,0; емульгатор 1 – 5,0; ПЕО 1500 – 28,0; ПЕО 400 – 52,0) з високою протимікробною активністю стосовно домінуючих різновидів збудників ранової інфекції (патент на корисну модель № 110799 UA «Лікувально-косметичні фітозасоби для місцевого застосування»). Нова мацева композиція на основі ЕХВ 5 % та допоміжних речовин з протимікробною активністю пропонується для проведення наступних етапів випробувань промислового виготовлення препарату з подальшим застосуванням у хірургічній практиці для підвищення ефективності лікування інфікованих ран.

Розроблено і видано методичні рекомендації «Методи розрахунку інтегральних показників протимікробної активності антибактеріальних лікарських засобів» (Київ, 2015) та інформаційний лист МОЗ України № 65–2015 (Київ, 2015) з описом удосконаленого методу інтегрального оцінювання протимікробної активності препаратів.

Запропоновано галузеве нововведення для впровадження в практику охорони здоров'я України «Протимікробний засіб для підвищення ефективності лікування та профілактики запальних захворювань ротової порожнини (ЗЗРП)» (Інформаційний бюлетень НАМН України. Київ, 2017).

Отримані результати наукових досліджень щодо протимікробних властивостей ЕХВ та мазевих композиції на його основі впроваджено в науково-дослідну діяльність лабораторії та клінічний відділ молекулярної імунофармакології ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України» (акт впровадження від 31.03.2021 р.) та в навчальний процес кафедри мікробіології, вірусології та епідеміології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (акт впровадження від 17.02.2019 р.), кафедри мікробіології, вірусології та імунології Запорізького державного медичного університету МОЗ України (акт впровадження від 11.01.2021).

Особистий внесок здобувача. Дисертант самостійно провів інформаційно-патентний пошук за темою дисертації та аналіз літературних джерел щодо мікробіологічних аспектів ранової інфекції та перспектив розробки протимікробних фітозасобів. Разом з науковим керівником сформульовано тему, мету та завдання дисертаційної роботи.

Автором самостійно охарактеризовано протимікробну активність ЕХВ за показниками МІК, МБК та МФК на музейних тест-штамах мікроорганізмів; дисертантом особисто визначено швидкість формування резистентності до ЕХВ у *S. aureus* і *P. aeruginosa*. Дисертантом особисто вперше в Україні досліджено цитотоксичність ЕХВ на лінійних культурах епітеліальних клітин (Нер-2) та фібробластів (М-19) людини. Для підвищення ефективності лікування інфікованих ран здобувачем розроблено експериментальні зразки мазевих композицій з ЕХВ та допоміжних речовин із високою біодоступністю, особисто доведено високу протимікробну активність мазевих композицій на основі ЕХВ відносно музейних тест-штамів мікроорганізмів та клінічних домінуючих різновидів збудників ранової інфекції.

Дисертантом здійснено аналіз та узагальнення досліджень, виконана статистична обробка результатів досліджень за допомогою методів математичної статистики. Автором визначено основні практичні та теоретичні положення, надано практичні рекомендації та висновки, матеріали дисертаційної роботи впроваджено в навчальний процес закладів вищої освіти України.

Персональний внесок автора у всіх опублікованих зі співавторами працях наводиться за текстом дисертації та в авторефераті у списку наукових публікацій.

Апробація результатів дисертації. Основні результати досліджень та положення дисертації були представлені та обговорені на: міжнародній науково-практичній конференції "Сучасний вибір медичної науки та практики" (Дніпро, 2018); міжнародній науково-практичній конференції "Медична наука та практика на сучасному етапі" (Київ, 2018); міжнародній науково-практичній конференції "Теоретичні та практичні аспекти розвитку сучасної медицини"

(Львів, 2019); науково-практичній конференції з міжнародною участю "Перший національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів, паразитологів" (Харків, 2019); науково-практичній конференції "Мікробіологічні читання пам'яті професора Юрія Леонідовича Волянського" (Харків, 2020); науково-практичній конференції з міжнародною участю "Другий національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини, присвячений 175-річчю з дня народження І. І. Мечникова" (Харків, 2020).

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 25 наукових праць, з них 4 монографії (3 - закордонні), 6 статей у наукових фахових виданнях (2 – у закордонних виданнях), 1 патент України на корисну модель, 1 методичні рекомендації, 1 інформаційний лист МОЗ України, 1 нововведення та 11 тез у матеріалах міжнародних з'їздів та науково-практичних конференцій.

Структура і обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 143 сторінках і складається з вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, 5 розділів власних досліджень, висновків, практичних рекомендацій і списку літератури. Робота містить 9 таблиць і 6 рисунків. Список використаної літератури включає 163 джерела, з них 33 кирилицею та 130 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. В огляді літератури висвітлено значення мікробних чинників в генезисі ускладненого ранового процесу. Проблема профілактики і лікування інфікованих ран потребує нагального вирішення з урахуванням зростання резистентності мікроорганізмів до антимікробних засобів. Висвітлено актуальність застосування м'яких лікарських засобів із протимікробною дією в комплексному лікуванні інфікованих ран. З'ясовано, що одним із перспективних напрямів вирішення наукового завдання є використання фітотерапевтичних протимікробних засобів, у тому числі на основі хмелепродуктів, які володіють широким спектром корисної біологічної активності (протимікробної, протизапальної, болетамуючої та ін.).

Матеріали і методи дослідження. Вивчення чутливості мікроорганізмів до дії ЕХВ проводили методом двократних серійних розведень (до його кінцевих концентрацій 40,0; 20,0; 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,75; 0,38 мг/мл) у рідких поживних середовищах Мюллера-Хінтона (для бактерій) та Сабуро (для грибів) із визначенням показників мінімальної інгібуючої концентрації (МІК), мінімальної бактерицидної концентрації (МБК) та мінімальної фунгіцидної концентрації (МФК). Контролем слугували пробірки із відповідними середовищами без ЕХВ. Мікробне навантаження становило $1,5 \times 10^8$ КУО/мл, що при візуальному контролі відповідає стандарту мутності 0,5 за McFarland.

Визначення протимікробної дії ЕХВ проведено на семи референтних тест-штамах мікроорганізмів різних таксономічних груп: *S. aureus* ATCC 25923, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* ATCC 25922 та *K. pneumoniae* ATCC 13883, *P. aeruginosa* ATCC 27853 і *C. albicans* ATCC 885-

653, які були отримані з лабораторії загальної мікробіології з Музеєм мікроорганізмів ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України». Термін та умови інкубації в експериментах відповідали видовим особливостям тест-штамів мікроорганізмів.

Показник МІК ЕХВ оцінювали візуально за наявністю або відсутністю зростання каламутності середовища в пробірках (у порівнянні із контролем) по закінченню терміну інкубації. Концентрацію ЕХВ в останній пробірці із відсутністю видимого росту тест-штаму вважали МІК препарату. Для визначення МБК та МФК ЕХВ із 2-3 останніх пробірок без ознак видимого росту бактерій та грибів проводили висів 0,1 мл вмісту кожної з них на чашки з щільними поживними середовищами Мюллера-Хінтона та Сабуро, відповідно. Температурний режим і тривалість інкубації висівів були оптимальними для кожного виду мікроорганізму. Найменша концентрація ЕХВ, яка забезпечувала повну відсутність росту колоній мікроорганізмів на чашках із поживними середовищами, відповідала його МБК або МФК.

Швидкість формування резистентності у мікроорганізмів до ЕХВ, вивчали *in vitro* методом багаторазових пасажів з оцінкою збільшення МІК. Досліди виконувались на тест-штамах як Гр+ (*S. aureus*), так і Гр- бактерій (*P. aeruginosa*), а також грибів роду *Candida*. Формування резистентності мікроорганізмів до ЕХВ проводили в бульйоні Мюллера-Хінтона та на агарі Сабуро з наростаючими концентраціями речовин, що вивчали. Всього виконано по тридцять пасажів мікроорганізмів у п'яти повтореннях.

Вивчення цитотоксичної дії ЕХВ проводили на культурах перещеплюваних ліній епітеліальних клітин аденокарциноми гортані людини (Нер-2) та диплоїдних фібробластів людини (М-19), отриманих із клітинного банку ліній з тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіології імені Р.Є. Кавецького НАН України. Вирощування клітинних культур проводили в одноразових 12-лункових планшетах виробництва "Greiner Bio One GmbH" (Німеччина). Для формування моношарів клітинних культур застосовували ростове живильне середовище RPMI-1640 із L-глутаміном виробництва ООО «Биолот» (РФ), до якого додавалось 10 % ембріональної телячої сироватки того ж виробника. Підтримувальне середовище було аналогічного складу без сироватки. Для промивання клітинних моношарів використано розчин Версена виробництва "Предприятия ПанЭко" (РФ). Культури клітин Нер-2 і М-19 культивували за класичним методом. Посівні концентрації близько $0,5 \times 10^6$ клітин/мл, тривалість культивування 48 год. за температури 37 °С в атмосфері 5 % CO₂. Формування суцільного моношару контролювали за допомогою світлової мікроскопії. Лінії клітин пройшли адаптацію до умов культивування шляхом чотирьох послідовних пасажів. Після повного формування моношару (стаціонарна фаза росту клітин) ростове середовище із лунок планшета повністю видаляли, а клітини двічі промивали середовищем підтримування, після чого вносили ЕХВ у дворазових серійних розведеннях (160,0; 80,0; 40,0; 20,0; 10,0; 5,0; 2,5; 1,25 та 0,75 мг/мл) у ростовому середовищі. Кожна концентрація ЕХВ тестувалась на

моношарах обох ліній клітин у трьох паралельних повторах. Інкубування здійснювалось за вищевказаних умов із контрольним переглядом виявлення дії ЕХВ на клітинні моношари через 24, 48 та 72 години. Оцінку цитотоксичності ЕХВ проведено за показниками змін клітин у моношарі: їх округлення (ОК), грануляція цитоплазми (ГЦ), утворення вакуолей (УВ), ознак дегенерації (ОД) та лізису клітин (ЛК), а також руйнування моношару (РМ). Мінімальна токсична концентрація (МТК у мг/мл) ЕХВ була визначена як найменша його концентрація, що індукує токсичний ефект на клітинні культури, мікроскопічно виявлений після 72 г інкубації. Цитотоксичну концентрацію (ЦК₅₀ у мг/мл) ЕХВ, яка викликає загибель 50 % культур клітин Нер-2 і М-19 визначали на основі кривих виживання "доза-ефект" методом регресійного аналізу. Підрахунок життєздатних і нежиттєздатних клітин (знятих після 72 г інкубації із поверхні лунок після обробки розчином Версена) проведено у камері Горяєва за ознаками відмінності їх забарвлення 0,4 % розчином трипанового синього. Клітини, які набули дифузного забарвлення у синій колір, вважали нежиттєздатними, а незабарвлені – життєздатними. Індекс селективності (ІС) ЕХВ розраховували як співвідношення ЦК₅₀ до МІК, який є основним критерієм при вивченні очікуваної специфічної (протимікробної) дії лікарського засобу за умов порівняння з його можливим небажаним впливом (цитотоксичністю) на організм людини.

Для створення серії нових мазевих композицій на гідрофільній основі з ЕХВ та допоміжними речовинами (полісорбітол 80, емульгатор № 1, пропіленгліколь) було розроблено чотирьохстадійний технологічний процес: розраховану кількість активної речовини і допоміжних компонентів зважували та передавали на стадії технологічного процесу виготовлення; ПЕО 1500 прогрівали при температурі 55-60 °С до повного розплавлення, після чого додавали 2/3 частини маса/маса ПЕО 400 та емульгатору № 1 і перемішували, охолоджуючи інгредієнти основи та температури 38-43 °С, до одержання однорідної маси; ЕХВ розчиняли у 1/3 частини маса/маса ПЕО 400 при температурі 38-43 °С до повного розчинення, зазначений розчин поступово вводили у готову основу при температурі 38-43 °С і перемішували, охолоджуючи до кімнатної температури та одержання гомогенної маси.

Протимікробну дію нових мазевих композицій з ЕХВ визначали за допомогою напівкількісного дифузійного методу "колодязів", який заснований на здатності композицій проникати в товщу агару та інгібувати в ньому ріст мікроорганізмів. В якості нижнього шару використовували поживні середовища 2 % МПА і агар Сабуро. Верхнім шаром для формування колодязів слугували 0,5 % агаризовані аналогічні поживні середовища із вмістом близько 10⁵ КУО/мл досліджуваних музейних штамів та клінічних ізолятів мікроорганізмів. Діаметр колодязів (8,0±0,1) мм і висота (5,0±0,1) мм, в які вносили 0,25 – 0,30 мл мазевих композицій з ЕХВ та зразки препарату порівняння. Після належної інкубації проводили облік результатів шляхом вимірювання діаметрів зон пригнічення росту. Результати, одержані за даним методом, проводили у п'яти повтореннях (Волянський Ю. Л. та ін., 2004).

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням Microsoft Excel 2016. При оцінюванні значень протимікробної активності ЕХВ, зразків мазевих композицій і препарату порівняння застосовували двохвибірковий t-тест. Рівень відмінностей оцінювали як статистично значимий при $p < 0,05$.

Результати власних досліджень та їх обговорення. У *третьому розділі* охарактеризовано протимікробну активність ЕХВ за показниками МІК, МБК та МФК на тест-штамах грампозитивних (*S. aureus* ATCC 25923, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *B. cereus* ATCC 10702) та грамнегативних (*E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *P. aeruginosa* ATCC 27853) бактерій та грибів *C. albicans* ATCC 885-653. Визначення МІК проведено методом серійних розведень у рідких поживних середовищах, МБК та МФК - шляхом дозованого висіву на певні тверді поживні середовища із серії суспензій без ознак видимого росту для контролю виживання мікроорганізмів.

Результати попереднього дослідження антибактерійної і антимікотичної активності різних градієнтів ЕХВ наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Протимікробна активність градієнтних концентрацій ЕХВ

Штами мікроорганізмів	Ознаки росту при концентрації ЕХВ, мг/мл						
	40,0	20,0	10,0	5,0	2,5	1,25	0,75
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-*	+	+**
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	-	-	-	-	-	+	+
<i>B. cereus</i> ATCC 10702	-	-	-	-	-	+	+
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	-	-	-	-	-	+	+
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	+	+	+
<i>C. albicans</i> ATCC 885-653	-	-	-	-	+	+	+

Примітки: * - затримка росту мікроорганізма; ** - ріст мікроорганізма.

За результатами попереднього визначення для штамів *S. aureus* ATCC 25923, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* ATCC 25922 та *K. pneumoniae* ATCC 13883 антибактерійна дія ЕХВ відмічена в концентраціях вищих за 1,25 мг/мл, а для *P. aeruginosa* ATCC 27853 та антимікотична для грибів *C. albicans* ATCC 885-653 2,5 мг/мл і більше (табл. 1).

Більш точні дискримінативні дослідження у вищезазначених межах кінцевих концентрацій ЕХВ дозволило визначити показники МІК, МБК і МФК, які відображено в таблиці 2.

Аналіз даних таблиці 2 засвідчує, що МІК ЕХВ для грампозитивних бактерій знаходиться в межах від 1,69 до 2,05 мг/мл (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *B. cereus*), для грамнегативних – від 2,15-2,26 (*E. coli*, *K. pneumoniae*) до 3,40 мг/мл (*P. aeruginosa*), тоді як МІК ЕХВ щодо *C. albicans* сягала 4,15 мг/мл. Подібна закономірність дії ЕХВ встановлена і за показником МБК, яка для бактерій коливається від 3,38 до 7,14 мг/мл, а фунгіцидний ефект (МФК) ЕХВ

досягався при збільшенні його концентрації майже у 2 рази відносно МІК і становив для *C. albicans* 8,53 мг/мл.

Таблиця 2

Протимікробна активність ЕХВ за показниками МІК, МБК і МФК

Штами мікроорганізмів	Протимікробна активність ЕХВ, мг/мл, M±m*		
	МІК	МБК	МФК
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1,69±0,20	3,38±0,09	-**
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	1,85±0,20	3,70±0,09	-
<i>B. cereus</i> ATCC 10702	2,05±0,20	4,72±0,10	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2,15±0,17	4,30±0,20	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	2,26±0,09	4,77±0,09	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	3,40±0,20	7,14±0,20	-
<i>C. albicans</i> ATCC 885-653	4,15±0,17	-	8,53±0,11

Примітка: * - показник розраховано за результатами трьох паралельних досліджень; ** - показник не визначався.

У **четвертому розділі** наведено результати дослідження швидкості формування резистентності у збудників ранової інфекції до дії ЕХВ, які продемонстровано на рисунках 1 - 3.

Аналіз діаграми 1 із представленою динамікою формування резистентності *S. aureus* до ЕХВ свідчить, що резистентність у всіх досліджених культур стафілококів формується досить повільно. Початкова МІК до 10 пасажу штамів *S. aureus* зростає не більше ніж у 2 рази, а на 20 пасажі зафіксовано її зростання у 3-4 рази. Більш інтенсивне зростання набутої стійкості у стафілококів до дії ЕХВ спостерігалось із 25 по 30 пасаж, що підтверджує зростання відповідної МІК від 4-5 до 6-8 разів. Слід відзначити про певну варіабельність динаміки формування резистентності у різних штамів стафілококів: МІК від її початкового значення на 30 пасажі зросла у *S. aureus* колекція лабораторії протимікробних засобів (КЛПЗ-1), КЛПЗ-2 та КЛПЗ-3 у 6, 7 та у 8 разів, відповідно. При цьому, медіана кінцевої МІК набутої резистентності стафілококів до ЕХВ становить для *S. aureus* – 11,83 мг/мл. Як видно із представлених на рисунку 2 даних, у збудників синьогнійної ранової інфекції більш швидко формується резистентність до дії ЕХВ, ніж у золотистих стафілококів. Так, на 10 пасажі у штамів *P. aeruginosa* відмічено зростання МІК у 3-4 рази, а на 20 пасажі – у 6-8 разів. На подальших пасажах спостерігалось стійка (близька до лінійної) закономірність зростання набутої резистентності, яка на 30 пасажі за показником початкової МІК збільшилась у 12-15 разів у різних культур цих бактерій. Значення медіани кінцевої МІК набутої штамми *P. aeruginosa* КЛПЗ-30, КЛПЗ-31 та КЛПЗ-32 резистентності до ЕХВ досягло 45,3 мг/мл.

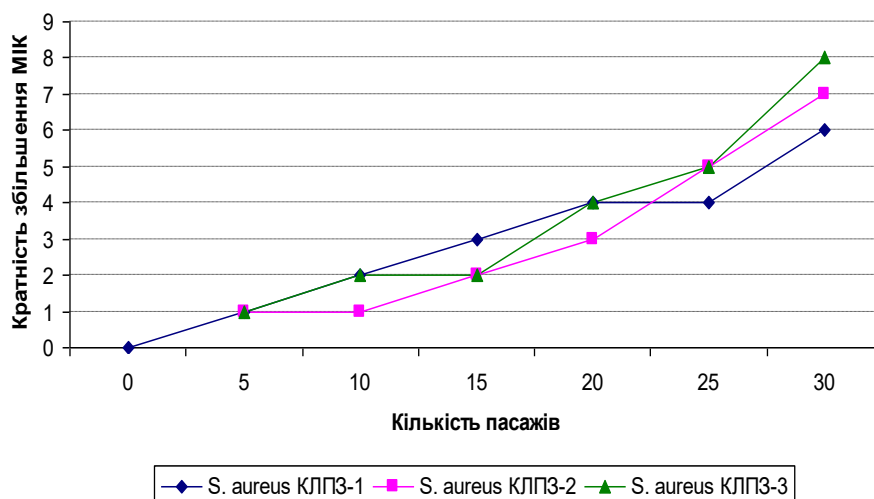


Рис. 1. Динаміка формування резистентності *S. aureus* КЛПЗ-1, КЛПЗ-2 та КЛПЗ-3 до ЕХВ.

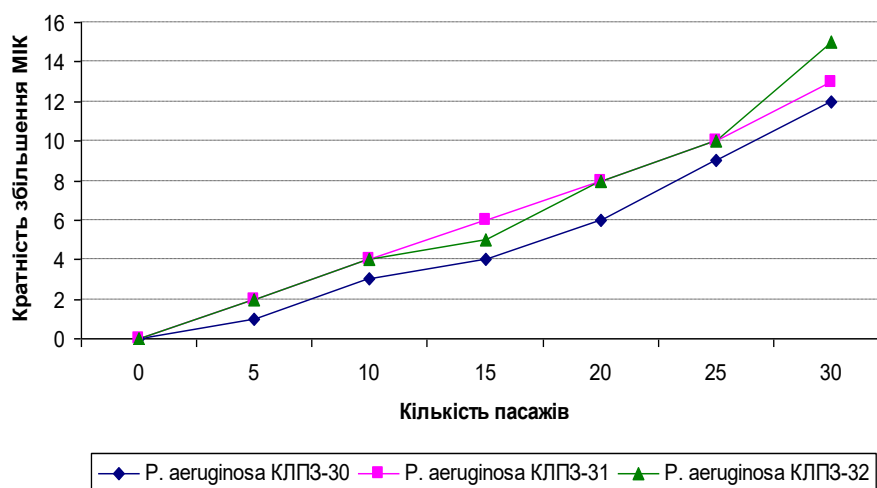


Рис. 2. Динаміка формування резистентності *P. aeruginosa* КЛПЗ-30, КЛПЗ-31 та КЛПЗ-32 до ЕХВ.

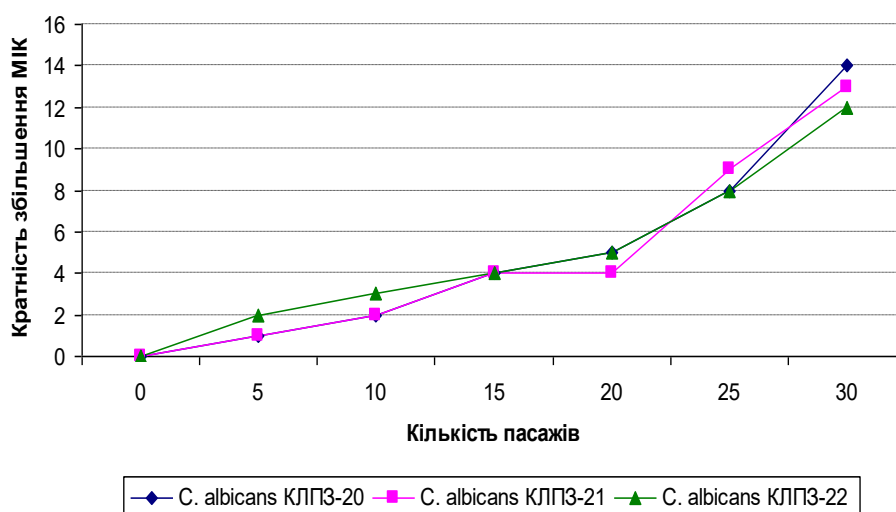


Рис. 3. Динаміка формування резистентності *C. albicans* КЛПЗ-20, КЛПЗ-21 та КЛПЗ-22 до ЕХВ.

У клінічних ізолятів *C. albicans* динаміці формування резистентності до ЕХВ притаманні певні особливості (рис. 3). Якщо до 10-20 пасажу вона була подібною до набуття стійкості бактеріями (*S. aureus* і *P. aeruginosa*) і відзначалась поступовим зростанням МІК у 2-3 і 4-5 разів, відповідно, то у подальшому динаміка формування резистентності у грибів роду *Candida* відбувалася більш інтенсивно. Так, вихідна МІК ЕХВ для штамів *C. albicans* КЛПЗ-20, КЛПЗ-21 та КЛПЗ-22 на 25 пасажі зросла у 8-9 разів, а на 30 пасажі зафіксовано її зростання у 12-14 разів. При цьому, як і для досліджених збудників ранової інфекції бактеріальної етіології, так і для різних штамів грибів роду *Candida* відмічена деяка варіабельність у швидкості набуття стійкості до дії ЕХВ (рис. 3). Визначена медіана кінцевого значення МІК ЕХВ (на 30 пасажі) для досліджених штамів *C. albicans* становить 53,95 мг/мл.

У **п'ятому розділі** представлено дослідження цитотоксичності ЕХВ. Встановлено, що впродовж всього терміну спостереження (72 години) концентрації ЕХВ від 0,75 до 2,5 мг/мл не виявляли цитотоксичного ефекту на лінії еукаріотичних клітин (табл. 3). Перші прояви цитотоксичності дії на клітини Нер-2 (грануляція цитоплазми - ГЦ, утворення вакуолей - УВ) виявлялись при концентрації ЕХВ 5,0 мг/мл і вище вже через 24 години експозиції, а на клітини М-19 (ГЦ) в цей же термін при концентрації ЕХВ $\geq 10,0$ мг/мл. Збільшення тривалості дії концентрацій ЕХВ від 5,0 до 160,0 мг/мл супроводжувалось наростанням його цитотоксичних ефектів, прояви яких через 72 години спостереження відображено у табл. 3.

Таблиця 3

Прояви цитотоксичної дії на лінії клітин Нер-2 та М-19 різних концентрацій ЕХВ через 72 години експозиції

Лінія клітин	Прояви цитотоксичної дії різних концентрацій ЕХВ, мг/мл								
	160,0	80,0	40,0	20,0	10,0	5,0	2,5	1,25	0,75
Нер-2	ОК	ОК	ОК	ОК	ОК	ГЦ	ВП	ВП	ВП
	ГЦ	ГЦ	ГЦ	ГЦ	ГЦ	УВ			
	УВ	УВ	УВ	УВ	УВ				
	ОД	ОД	ОД	ОД	ОД				
	ЛК	ЛК	ЛК	ЛК					
	РМ	РМ							
М-19	ОК	ОК	ОК	ОК	ГЦ	ВП	ВП	ВП	ВП
	ГЦ	ГЦ	ГЦ	ГЦ					
	УВ	УВ	УВ	УВ					
	ОД	ОД	ОД	ОД					
	ЛК	ЛК	ЛК						
	РМ								

Примітки: ОК - округлення клітин, ГЦ - грануляція цитоплазми, УВ - утворення вакуолей, ОД - ознаки дегенерації клітин, ЛК - лізис клітин, РМ - руйнування моношару, ВП –відсутність проявів.

Виявлено, що збільшення концентрації ЕХВ індукувало розширення спектру ознак цитотоксичності. Так, на лініях клітин Нер-2 та М-19 при концентрації ЕХВ 10,0 і 20,0 мг/мл, відповідно, крім ГЦ і УВ спостерігалось округлення клітин (ОК) та інші ознаки дегенерації (ОД). Дія концентрацій $\geq 10,0$ мг/мл на клітини Нер-2 та $\geq 20,0$ мг/мл на клітини М-19 призводила до лізису певної частки клітин (ЛК) в моношарі. Виражені ознаки руйнування моношару (РМ) клітин Нер-2 спостерігались за концентрації ЕХВ 80,0 мг/мл і більше, тоді як у клітин М-19 - при 160,0 мг/мл (табл. 3).

Отже, лінії епітеліальних клітин та фібробластів людини істотно відрізняються за рівнем чутливості до дії ЕХВ ($U_{\phi} \leq U_{Sr}$). При цьому, МТК ЕХВ для клітин Нер-2 визначено на рівні 5,0 мг/мл, а для клітин М-19 – 10,0 мг/мл.

Враховуючи, що мінімальні прояви цитотоксичної дії ЕХВ (ГЦ, УВ) достовірно не вказують на загибель, чи збереження життєздатності клітин Нер-2 та М-19, проведено кількісне визначення його цитотоксичної концентрації, яка викликає загибель 50 % клітин цих культур (ЦК₅₀).

Графічне зображення загальних закономірностей виживання клітин ліній Нер-2 і М-19 при дії різних концентрацій ЕХВ після 72 годин інкубації представлено на рис. 4 і 5.

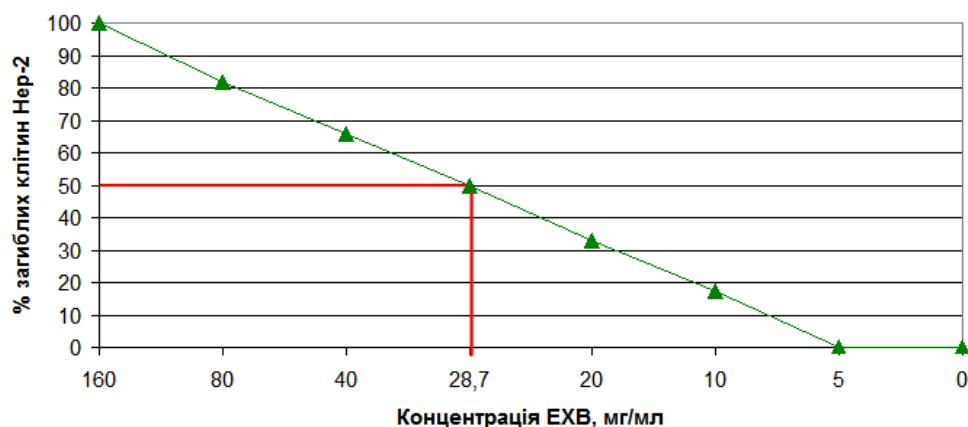


Рис. 4. Крива виживання клітин лінії Нер-2 в умовах дії різних концентрацій ЕХВ після 72 годин інкубації.

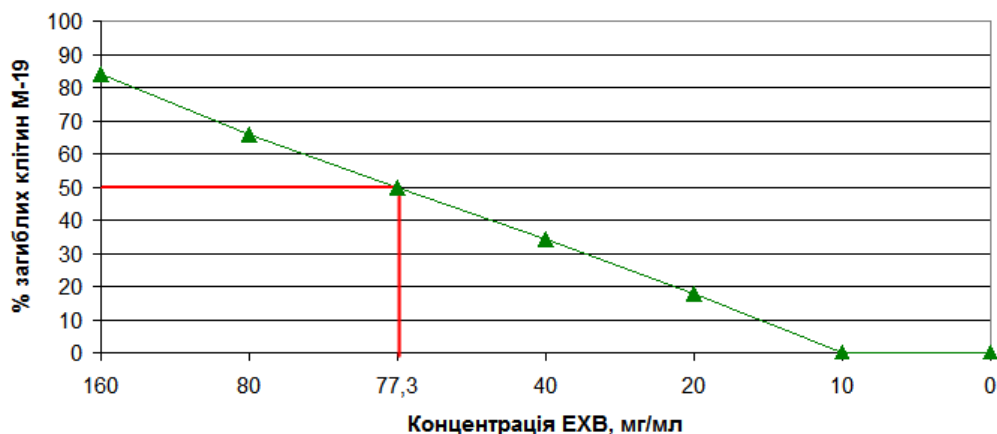


Рис. 5. Крива виживання клітин лінії М-19 в умовах дії різних концентрацій ЕХВ після 72 годин інкубації.

Як видно із даних рисунків 4 і 5, відносна кількість (%) загиблих клітин обох ліній корелює із концентрацією ЕХВ за прямою лінійною регресією.

Визначення показника ЦК₅₀ проведено в автоматичному режимі методом регресійного аналізу за допомогою "Пакету аналізу" програми Microsoft Excel 2016. Для культури клітин лінії Нер-2 ЦК₅₀ ЕХВ становить 28,7 мг/мл, а для клітин лінії М-19 сягає 77,3 мг/мл, тобто є більшою у 2,7 рази.

Отримані результати протимікробної активності (МІК) та цитотоксичної дії (ЦК₅₀) ЕХВ дозволили розрахувати його індекси селективності (ІС) для різних видів мікроорганізмів та ліній еукаріотичних клітин (табл. 4).

Таблиця 4

Індекс селективності ЕХВ за протимікробною та цитотоксичною дією

Мікроорганізм, МІК у мг/мл	ІС					Лінія клітин, ЦК ₅₀ , мг/мл
<i>S. aureus</i> ATCC 25923, 1,69	17,0					Нер-2, 28,65
		45,7				М-19, 77,29
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, 3,40			8,4			Нер-2, 28,65
				22,7		М-19, 77,29
<i>C. albicans</i> ATCC 885-653, 4,15					6,9	Нер-2, 28,65
					18,6	М-19, 77,29

Враховуючи МІК усіх видів типових штамів мікроорганізмів та ЦК₅₀ обох клітинних ліній величина ІС ЕХВ коливалась у межах від 6,9 до 45,7. При цьому, його найвищий рівень (17,0 і 45,7) встановлено для *S. aureus* ATCC 25923, а найнижчий (6,9 і 18,6) – для *C. albicans* ATCC 885-653. Тобто, співвідношення МІК ЕХВ щодо найбільш клінічно значущих збудників інфекційного ускладнення ранового процесу та його ЦК₅₀ відносно епітеліальних клітин та фібробластів людини у цілому є достатньо прийнятним для використання ЕХВ як основної діючої речовини для розробки нових мазевих композицій із протимікробними властивостями.

У *шостому розділі* представлено склад нових мазевих композицій з ЕХВ та допоміжними речовинами. Якісний і кількісний склад експериментальних мазевих композицій представлено в таблиці 5. При цьому, концентрація ЕХВ у зразках варіювала від 1,0 до 5,0 мас. %. Пропіленгліколь до п'яти композицій був доданий у кількості 10,0 мас. %. Полісорбат 80 входив до складу трьох зразків у концентрації 1,0 та 3,0, а емульгатор №1 - до чотирьох мазей у кількості 3,0 і 5,0 мас. %. Усі виготовлені мазеві композиції містили ПЕО 1500 від 20,0 до 30,0 та ПЕО 400 від 52,0 до 79,0 мас. %.

Склад експериментальних мазевих композицій з ЕХВ

Найменування інгредієнтів	Склад маzewої композиції (мас. %)							
	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8
ЕХВ	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	3,0	5,0
Пропіленгліколь	-	-	-	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Полісорбат 80	-	1,0	3,0	-	-	1,0	-	-
Емульгатор № 1	-	-	-	3,0	5,0	-	5,0	5,0
ПЕО 1500	20,0	26,0	26,0	30,0	28,0	28,0	28,0	28,0
ПЕО 400	79,0	72,0	70,0	56,0	56,0	60,0	54,0	52,0

Як видно із даних таблиці 5 експериментальна мазева композиція № 1 містить у своєму складі ЕХВ у концентрації 1,0 мас. % та в якості допоміжних речовин – ПЕО 400 і 1500. Склад композицій №№ 2 і 3 відрізняються від № 1 наявністю полісорбату 80 та кількісним вмістом ПЕО 400 і ПЕО 1500. Відмінність складів композицій №№ 4 і 5 від № 1, полягала у тому, що до них було додатково внесено пропіленгліколь і емульгатор № 1. Зразок № 6 був найбільш близьким за складом композиції № 2, за винятком пропіленгліколю, який було внесено до зазначеного зразка мазі. Мазеві композиції №№ 7 і 8 майже ідентичні складу зразка № 2, але відрізняються від нього відсутністю полісорбату 80, наявністю емульгатора № 1, вмістом допоміжних речовини ПЕО 400 і ПЕО 1500 та концентраціями ЕХВ – 3,0 і 5,0 мас. %, відповідно.

Перспективність використання таких мазевих композицій для підвищення ефективності лікування інфікованих ран обґрунтовано рядом наступних положень:

- *Humulus lupulus* L. містить комплекс БАР (флавоноїдів, гіркот, фенольних сполук, ефірних масел, гормонів, вітамінів), що обумовлює його бактерицидну, протизапальну, болезаспокійливу та гіпосенсибілізуючу дію;
- численна кількість районованих сортів доступна в Україні і є дешевою сировиною медичного призначення;
- ЕХВ має доволі просту технологією виготовлення та більш низьку собівартість виробництва, що обумовлює його економічну доцільність використання при розробці протимікробних засобів;
- ЕХВ притаманний широкий спектр та достатній рівень протимікробної активності за показниками МІК, МБК та МФК відносно референтних тест-штамів мікроорганізмів;
- повільним формуванням резистентності у домінуючих різновидів збудників ранової інфекції до дії ЕХВ;
- відносно низькою цитотоксичністю ЕХВ до епітеліальних та фібробластних клітин людини.

Крім того, встановлено, що за органолептичними характеристиками всі мазеві композиції цілком відповідають вимогам ДФУ 2.0 до м'яких лікарських форм і правилам виготовлення та контролю якості нестерильних лікарських

засобів в аптеках, які регулюються наказами МОЗ України від 17.10.2012 р. № 812 і від 01.07.2015 р. № 398 і характеризуються: гомогенністю, жовто-зеленим кольором, характерним запахом хмелепродуктів, $Ph = 6,0-7,0$, структурною в'язкістю 7,15 – 54,83 Па•с, осмотичною активністю 65 % та термостабільністю.

У *сьомому розділі* наведено результати визначення чутливості референтних та клінічних штамів збудників ранової інфекції до дії експериментальних зразків мазевих композицій з ЕХВ. Результати дослідження протимікробної активності восьми нових мазевих композицій з ЕХВ стосовно семи референтних тест-штамів мікроорганізмів представлено у табл. 6.

Таблиця 6

Протимікробна активність мазевих композицій з ЕХВ відносно референтних штамів мікроорганізмів

Тест-штами мікроорганізмів	Діаметр зони затримки росту мікроорганізмів унаслідок дії мазевих композицій №№ 1-8, мм ($M \pm m$)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	25,0 ±1,5	24,5 ±0,6	26,5 ±0,6	21,5 ±0,5	21,0 ±0,8	21,5 ±0,7	32,0 ±1,4	35,0 ±0,5 ¹⁾
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	23,5 ±0,8	22,0 ±1,1	24,5 ±1,1	20,5 ±1,3	21,0 ±1,2	20,5 ±0,7	27,5 ±1,8	33,0 ±1,4 ¹⁾
<i>B. cereus</i> ATCC 10702	17,0 ±1,1	15,5 ±1,3	18,0 ±0,9	12,5 ±0,4	13,0 ±0,3	14,0 ±0,6	20,5 ±1,4	22,5 ±0,6 ¹⁾
<i>E. coli</i> ATCC 25922	24,0 ±1,2	24,0 ±1,7	25,0 ±1,6	19,0 ±0,8	20,0 ±0,9	19,0 ±0,4	29,0 ±0,6	31,5 ±1,5 ¹⁾
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	20,0 ±1,2	20,0 ±0,7	19,5 ±1,8	18,5 ±1,8	18,0 ±1,5	17,0 ±1,4	24,0 ±0,7	28,5 ±1,8 ¹⁾
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	18,0 ±0,7	16,5 ±1,6	20,0 ±0,4	13,0 ±1,6	14,5 ±0,4	15,5 ±1,3	21,5 ±0,6	25,0 ±1,1 ¹⁾
<i>C. albicans</i> ATCC 885-653	14,5 ±0,9	13,0 ±1,4	14,0 ±1,3	11,0 ±1,6	11,5 ±1,4	12,0 ±1,1	17,0 ±1,2	19,0 ±0,4 ¹⁾

Примітка. ¹⁾ - $U_{\phi} \leq U_{st}$ при $p=0,05$ у порівнянні з композиціями №№ 1-7.

Визначення найбільш перспективного зразку маzewої композиції з ЕХВ здійснено з урахуванням сумарної протимікробної активності кожної композиції щодо усіх референтних штамів мікроорганізмів, оціненої за U -критерієм Манна-Уїтні.

Аналіз даних таблиці 6 демонструє залежність протимікробної активності композицій від їх якісного та кількісного складу. Введення до складу композицій №№ 4-6 пропіленгліколю (10,0 мас. %), як і до складу композицій №№ 4 та 5 емульгатору № 1 (відповідно 3,0 і 5,0 мас. %), а також включення полісорбату 80 (1,0 мас. %) у композицію № 6 не забезпечило виразну протимікробну дію цих композицій. Помірна стійкість до них спостерігалась у *B. cereus* ATCC 10702, *P. aeruginosa* ATCC 27853 і *C. albicans* ATCC 885-653. У

жодного з протестованих референтних штамів мікроорганізмів не було встановлено високий рівень чутливості до дії композицій №№ 4-6.

Додавання до композицій №№ 2 і 3 полісорбату 80 (відповідно 1,0 і 3,0 мас. %) при незначних відмінностях кількісного вмісту ПЕО 400 (від 70,0 до 72,0 мас. %) забезпечило їх відносно вищу протимікробну активність у порівнянні з композицією № 1. У цілому, до дії композицій №№ 2 і 3 всі тести мікроорганізмів були помірно чутливими (а штам *S. aureus* ATCC 25923 – високочутливим) за винятком *C. albicans* ATCC 885-653, який характеризувався помірною стійкістю (табл. 6).

Найвищі рівні протимікробної активності встановлено у композиції №№ 7 і 8, суттєва відмінність кількісного складу яких полягала у збільшенні концентрації ЕХВ до 3,0 та 5,0 мас.% відповідно ($U_{\phi} \leq U_{st}$ при $p=0,05$). При цьому, високу чутливість до дії композицій №№ 7 і 8 встановлено у штамів *S. aureus* ATCC 25923, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *E. coli* ATCC 25922 та *K. pneumoniae* ATCC 13883 і *P. aeruginosa* ATCC 27853 до композиції № 8, помірну – в інших референтних мікроорганізмів, включно з *C. albicans* ATCC 885-653.

За результатом співставлення суми рангів (U-критерій Манна-Уїтні) діаметрів зон затримки росту усіх референтних штамів мікроорганізмів під дією порівняних композицій №№ 7 і 8 найбільш перспективним визначено зразок мазевої композиції з ЕХВ № 8 ($U_{\phi} \leq U_{st}$ при $p=0,05$).

Експериментальні дані визначення протимікробної ефективності мазевої композиції з ЕХВ № 8 щодо клінічних ізолятів найбільш значущих видів збудників ранової інфекції наведено в таблиці 7, як препарат порівняння використано «Календули мазь (*Unguentum Caledulae*)» виробництва ТОВ «ДКП «Фармацевтична фабрика».

Таблиця 7

Протимікробна активність мазевої композиції з ЕХВ № 8 та календули мазі відносно клінічних штамів найбільш значущих збудників ранової інфекції

Види мікроорганізмів	Кількість штамів	Діаметр зони затримки росту мікроорганізмів унаслідок дії мазевої композиції № 8, мм ($M \pm m$)	
		мазева композиція №8	календули мазь
<i>A. baumannii</i>	3	22,5±0,8	20,5±0,9
<i>E. faecalis</i>	3	26,7±0,7 ¹⁾	20,7±0,6
<i>K. pneumoniae</i>	3	25,8±1,3	23,9±0,9
<i>P. aeruginosa</i>	3	23,4±0,5	23,7±1,1
<i>C. perfringens</i>	2	23,0±0,8	21,2±0,7
<i>S. aureus</i>	3	35,3±0,6 ¹⁾	25,4±0,5
<i>S. epidermidis</i>	3	34,0±0,8 ¹⁾	24,7±1,0
<i>S. pyogenes</i>	3	31,2±0,9 ¹⁾	24,9±0,3
<i>P. vulgaris</i>	2	26,8±1,2 ¹⁾	22,5±0,8
<i>B. subtilis</i>	2	23,0±0,6	21,4±0,7
<i>C. albicans</i>	3	19,9±0,4	17,9±0,6

Примітка. ¹⁾ - $U_{\phi} \leq U_{st}$ при $p=0,05$ у порівнянні з «Календули маззю».

Як видно з даних таблиці № 8 новий зразок мазевої композиції з ЕХВ № 8 характеризується високою антибактерійною активністю щодо *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *P. vulgaris* із зонами затримки росту в діапазоні (25,8±1,3) мм – (35,3±0,6) мм, які значно перевищували показники препарату порівняння (20,7±0,6) мм – (25,4±0,5) мм.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі на основі результатів експериментальних досліджень та їх теоретичних узагальнень вирішено наукове завдання розробки протимікробного засобу для лікування інфікованих ран. Проведено мікробіологічне обґрунтування біобезпечності ЕХВ та ефективності протимікробні дії нової мазевої композиції на основі ЕХВ 5 % та допоміжних речовин відносно домінуючих збудників ранової інфекції.

1. Вивчено протимікробну активність ЕХВ щодо тест-штамів мікроорганізмів різних таксономічних груп. Встановлено показники протимікробної активності ЕХВ: МІК для бактерій знаходиться в межах від 1,69 (*S. aureus* АТСС 25923) до 3,40 мг/мл (*P. aeruginosa* АТСС 27853) та 4,15 мг/мл для *C. albicans* АТСС 885-653, МБК коливається від 3,38 до 7,14 мг/мл, відповідно, а МФК становить 8,53 мг/мл.

2. Доведено повільне формування резистентності до дії ЕХВ у клінічних ізолятів *S. aureus*, *P. aeruginosa* та *C. albicans*. Динаміка поступового зростання резистентності спостерігалась з 5 до 20 пасажу із збільшенням МІК для бактерій у 3-8, а для грибів у 4 рази. Більш інтенсивне формування набутої резистентності відмічено з 20 до 30 пасажів з досягненням кінцевого рівня МІК (медіана) для *S. aureus* – 11,83, *P. aeruginosa* – 45,3 та *C. albicans* – 53,95 мг/мл.

3. Досліджено цитотоксичність ЕХВ на лінійних культурах епітеліальних клітин (Нер-2) та фібробластів (М-19) людини. Встановлено, що на лініях клітин Нер-2 і М-19 початкові цитотоксичні ефекти індукують концентрації ЕХВ $\geq 5,0$ і $\geq 10,0$ мг/мл із відповідними значеннями ЦК₅₀ 28,7 та 77,3 мг/мл. При цьому, з урахуванням МІК ЕХВ для мікроорганізмів різних таксономічних груп, величина його ІС коливалась у межах від 6,9 до 45,7 з найвищим рівнем 17,0 і 45,7 для *S. aureus* АТСС 25923 та найнижчим 6,9 і 18,6 для *C. albicans* АТСС 885-653.

4. Розроблено вісім експериментальних зразків (№№ 1-8) мазевих композицій з ЕХВ та допоміжними речовинами в різних концентраціях (мас. %): ЕХВ – від 1,0 до 5,0; пропіленгліколь - 10,0; полісорбат 80 – 1,0 і 3,0; емульгатор № 1 – 3,0 та 5,0; ПЕО 400 – від 52,0 до 79,0; ПЕО 1500 – від 20,0 до 30,0. За органолептичними характеристиками всі мазеві композиції відповідають вимогам ДФУ 2 до м'яких лікарських форм і характеризуються: гомогенністю, жовто-зеленим кольором, характерним запахом хмелепродуктів, Ph = 6,0–7,0, структурною в'язкістю 7,15 – 54,83 Па•с, осмотичною активністю 65 % та термостабільністю.

5. Найвищі рівні протимікробної активності встановлено у композицій №№ 7 і 8, суттєва відмінність кількісного складу яких полягала у збільшенні концентрації ЕХВ до 3,0 та 5,0 мас.% відповідно. При цьому, високу чутливість

до дії композицій №№ 7 і 8 встановлено у штамів *S. aureus* ATCC 25923, *S. pneumoniae* ATCC 49619 та *E. coli* ATCC 25922, а до композиції № 8 - додатково у штамів *K. pneumoniae* ATCC 13883 і *P. aeruginosa* ATCC 27853. За результатом співставлення суми рангів (U-критерій Манна-Уїтні) діаметрів зон затримки росту усіх референтних штамів мікроорганізмів під дією порівняних композицій №№ 7 і 8 найбільш перспективним визначено зразок мазевої композиції з ЕХВ № 8 ($U_{\phi} \leq U_{st}$ при $p=0,05$).

6. За результатами порівняльного дослідження протимікробної дії зразку мазевої композиції з ЕХВ № 8 і «Календули мазь» відносно тридцяти клінічних ізолятів домінуючих різновидів збудників ранової інфекції встановлено, що новий зразок мазевої композиції характеризується більш високою протимікробною активністю стосовно всіх протестованих мікроорганізмів: *A. baumannii*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *C. perfringens*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *P. vulgaris*, *B. subtilis*, *C. albicans* яка достовірно ($p < 0,05$) перевищує показники препарату порівняння.

Практичні рекомендації

Нова мазева композиція на основі ЕХВ 5 % та допоміжних речовин з протимікробною активністю пропонується для проведення наступних етапів випробувань промислового виготовлення препарату з подальшим застосуванням у хірургічній практиці для підвищення ефективності лікування інфікованих ран.

СПИСОК НАУКОВИХ РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Antibiotics and antimicrobial agents of plant origin in medical practice : monograph. / Eloeva Z. V., Makarenko V. D., Kazmirchuk V. V., Ivannik V. Yu., Kazmirchuk Vl. V., Melnyk A. L., Moiseienko T. N., Nevmerzhytskyi V. V., Yakovenko D. V. X.: ООО «Planet-print», 2020. 220 p. (Дисертантом наведено значення біологічно активних речовин екстракту хмелю вуглекислотного).

2. Khrystian G., Torianyk I., Nevmergitsky V. Principles of medicinal (liniment) preparations using in complex therapy of wound infection. chapter «medical sciences» : monograph. *Theoretical and practical aspects of the development of modern science: the experience of countries of Europe and prospects for Ukraine*. Riga, Latvia : "Baltija Publishing", 2018. P. 136–151. (Дисертантом проаналізовано застосування лікарських засобів в комплексній терапії ранової інфекції).

3. Khrystian G., Torianyk I., Nevmergitsky V. Role of hops-plant carbon dioxide preparations in elimination of complications of wound processes : monograph. *Development of modern science: the experience of European countries and prospects for Ukraine*. Riga, Latvia: "Baltija Publishing", 2019. С. 322–335. (Дисертантом висвітлено значення лікарських композицій на основі ЕХВ для запобігання ускладнень інфікованих ран).

4. Аналіз причин розвитку та сучасний погляд на патогенез і методи лікування *acne vulgaris* : collective monograph / Казмірчук В. В., Моїсеєнко

Т. М., Торяник І. І., Макаренко В. Д., Невмержицький В. В. *Development and modernization of medical science and practice: experience of Poland and prospects of Ukraine*. Lublin: Izdevnieciba "Baltija Publishing", 2017. Vol. 1. С. 102–117. (Дисертантом проаналізовано причини ускладнених форм *acne vulgaris* та методи лікування).

5. Study of antimicrobial activity of medications for wound treatment / N. N. Boyko, A. I. Zaytsev, T. P. Osolodchenko, A. L. Melnik, V. V. Nevmerzhitskiy, T. O. Volkov, V. V. Kazmirchuk. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. USA, 2015. Vol. 3, № 7. P. 350–355. (Дисертант визначив антимікробну дію препаратів для лікування ран).

6. Перспективы разработки лекарственных средств на основе углекислотного экстракта хмеля для лечения заболеваний стафилококковой этиологии / Казмирчук В. В., Иванник В. Ю., Невмержицкий В. В., Моисеенко Т. Н., Волков Т. А. *ACADEMY Journal*. 2018. № 2 (4). Spain, Barcelona. P.104-110. (Здобувачем проведені мікробіологічні дослідження лікарських засобів на основі ЕХВ з метою вивчення антистафілокової активності).

7. Антистафілококова активність вуглекислотного екстракту хмелю / Невмержицький В. В., Иванник В. Ю., Казмирчук В. В., Моисеенко Т. М., Волков Т. О., Торяник І. І., Сорокоумова Л. К., Сорокоумов В. П. *Вісник Вінницького національного медичного університету*. 2018. Т. 22, № 2. С. 297–300. (Автором досліджено антистафілококову активність ЕХВ).

8. Оцінка протимікробної активності спиртового екстракту хмелю / Казмирчук В. В., Мельник А. Л., Воронкіна І. А., Невмержицький В. В., Волков Т. О. *Вісник проблем біології і медицини*. 2015. Вип. 3, Т. 2 (123). С. 136–140. (Здобувач вивчив протимікробну активність спиртового екстракту хмелю).

9. Противомикробная активность препаратов для лечения инфекционных заболеваний пародонта / Бойко Н. Н., Зайцев А. И., Осолодченко Т. П., Мельник А. Л., Невмержицкий В. В., Волков Т. О., Казмирчук В. В. *Фітотерапія. Часопис*. 2015. № 2. С. 22–25. (Здобувач визначив активність протимікробних препаратів щодо збудників запальних захворювань пародонту).

10. Противомикробная активность вытяжек из растительного сырья, содержащего фенольные соединения. Сообщение 1 / Бойко Н. Н., Зайцев А. И., Осолодченко Т. П., Мельник А. Л., Невмержицкий В. В., Казмирчук В. В.. *Фармаком*. 2015. № 3/4. С. 59-65. (Здобувач визначив протимікробну дію ЕХВ та рослинної сировини з фенольними сполуками).

11. Лікувально-косметичні фітозасоби для місцевого застосування : пат. 110799 UA. u201603243 / М. М. Бойко, О. І. Зайцев, І. Д. Євтушенко, А. В. Євтушенко, Т. П. Осолодченко, В. В. Казмирчук, Т. О. Волков, В. В. Невмержицький, А. Л. Мельник, Т. М. Моисеенко, Є. Т. Жілякова, О. О. Новіков ; заявл. 29.03.2016 ; опубл. 25.10.2016. Бюл. № 20. 8 с. (Здобувач приймав участь у розробці мазевих композицій на основі екстракту хмелю вуглекислотного).

12. Методи розрахунку інтегральних показників протимікробної активності антибактеріальних лікарських засобів : [метод. рек.] / М. М. Бойко, О. І. Зайцев,

С. І. Похил, Т. П. Осолодченко, В. В. Казмірчук, Л. В. Нефьодова, Б. І. Гушилик, А. Л. Мельник, В. В. Невмержицький, Г. Є. Христян. Київ, 2015. 29 с. (Дисертант запропонував уніфікований метод порівняння моно- і полівидової протимікробної активності препаратів).

13. Протимікробний засіб для підвищення ефективності лікування та профілактики запальних захворювань ротової порожнини (ЗЗРТ) : [нововведення] / Бойко М. М., Зайцев О. І., Похил С. І., Осолодченко Т. П., Казмірчук В. В., Нефьодова Л. В., Гушилик Б. І., Мельник А. Л., Невмержицький В. В., Христян Г. Є. *Інформаційний бюлетень. Додаток до "Журналу Національної академії медичних наук України"*. Київ, 2017. Вип. 43. С. 76-77. (Здобувач приймав участь у розробці нового засобу для лікування захворювань ротової порожнини з протимікробною дією).

14. Метод інтегрального оцінювання протимікробної активності препаратів : інформ. лист № 65 про нововведення в сфері охорони здоров'я / О. І. Зайцев, Л. В. Яковлева, М. М. Бойко, С. І. Похил, Т. П. Осолодченко, Б. І. Гушилик, А. Л. Мельник, В. В. Невмержицький, Г. Є. Христян, І. П. Юдін, В. Д. Макаренко, В. В. Казмірчук. Київ, 2015. 6 с. (Здобувач запропонував інтегральний показник протимікробної активності препаратів, як вектор у n-вимірному просторі з координатами у вигляді МІК, МБК, або діаметру зон затримки росту).

15. Застосування вуглекислотного екстракту хмелю в сучасній урологічній практиці / І. І. Торяник, С. І. Похил, В. В. Казмірчук, В. Ю. Іваннік, Т. М. Моїсеєнко, В. Д. Макаренко, В. В. Невмержицький, М. І. Грищенко, В. М. Кривенко. *Урологія, андрологія, нефрологія – досягнення, проблеми, шляхи вирішення* : матеріали ювілейної науково-практичної конференції. Харків, 2018. С. 276–280. (Дисертант проаналізував дані сучасної медичної літератури щодо застосування ЕХВ в сучасній урологічній практиці).

16. Обґрунтування складу нового протимікробного засобу для лікування *acne vulgaris* / Т. М. Моїсеєнко, І. М. Довга, В. В. Невмержицький, І. В. Поволокіна, І. П. Юдін, Н. В. Непорада, В. В. Казмірчук. XV з'їзд товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського : тези допов., 11-15 вересня 2017 р. Одеса. – Львів, СПОЛОМ, 2017. С. 212. (Дисертант обґрунтував склад нового протимікробного засобу для лікування *acne vulgaris*).

17. Нові підходи до корегування тактики лікування ранових інфекцій / В. В. Невмержицький, І. М. Довга, В. В. Казмірчук, І. В. Поволокіна, Н. О. Волянська, В. Ю. Іваннік, О. О. Чумаченко. Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності : матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, 29 січня 2018 р. Чернівці, 2018. С. 20. (Здобувачем показано перспективи застосування нових композицій на основі ЕХВ для лікування ранових інфекцій).

18. Новий протимікробний засіб на основі спиртового екстракту хмелю для лікування інфікованих ран / В. В. Невмержицький, В. В. Казмірчук, І. М. Довга, І. В. Поволокіна, О. О. Радченко, Г. Є. Христян, І. П. Юдін. Сучасний вибір медичної науки та практики : матеріали міжнародної науково-практичної

конференції, 11-12 травня 2018 р. Дніпро, 2018. С. 104-106. (Здобувачем досліджено антибактерійну активність нового протимікробного засобу на основі спиртового екстракту хмелю)

19. *Humulus lupulus* L. історія відкриття і застосування (стислий екскурс) / В. В. Невмержицький, В. В. Казмірчук, І. І. Торяник, В. М. Грищенко, В. М. Кривенко, І. В. Канцибко. Щорічні терапевтичні читання. Профілактика неінфекційних захворювань – пріоритет сучасної науки та практики : матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, 20 квітня 2018 р. Харків, 2018. С. 164. (Дисертантом наведено цілющі властивості біологічно активних речовин хмелю.).

20. Фармакотерапевтична спрямованість сучасних галенових препаратів хмелю / В. В. Невмержицький, В. В. Казмірчук, І. І. Торяник, В. М. Грищенко, Н. Ф. Меркулова, І. В. Канцибко, А. І. Гордієнко. Щорічні терапевтичні читання. Профілактика неінфекційних захворювань – пріоритет сучасної науки та практики : матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, 20 квітня 2018 р. Харків, 2018. С. 165. (Дисертантом представлено перспективи формакокорекції ран препаратами хмелю).

21. Антимікробні властивості лікарських композицій у формі мазі на основі спиртового екстракту хмелю / В. В. Невмержицький, В. В. Казмірчук, І. Д. Довга, І. В. Поволокіна, І. П. Юдін. Медична наука та практика на сучасному етапі : матеріали міжнародної науково-практичної конференції, 4 – 5 травня 2018 р. Київ, 2018. С. 116–117. (Здобувачем проведено мікробіологічні дослідження лікарських композицій на основі спиртового екстракту хмелю).

22. Клініко-морфологічні характеристики мазевих композицій з екстратом хмелю вуглекислотного та їхнє застосування у лікуванні наслідків ранової інфекції / В. В. Невмержицький, В. В. Казмірчук, Н. М. Кононенко, І. І. Торяник, В. Ю. Іваннік, С. І. Похил, М. І. Грищенко, В. В. Гнатюк, Н. Ф. Меркулова. Перший національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів, паразитологів : науково-практична конференція з міжнародною участю, 16-17 травня 2019 року м. Харків. *Імунологія та алергологія: наука і практика*. Додаток № 1. 2019. № 1. С. 78–79. (Дисертантом наведено перспективи використання композицій на основі ЕХВ для лікування ранової інфекції).

23. Швидкість формування резистентності у клінічних штамів *S. aureus* і *P. aeruginosa* до дії екстракту хмелю вуглекислотного / Казмірчук В. В., Невмержицький В. В., Проценко Л. В., Іваннік В. Ю., Моїсеєнко Т. М., Волков Т. О., Юдін І. П., Мельник А. Л., Сорокоумов В. П. Теоретичні та практичні аспекти розвитку сучасної медицини : збірник тез наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції, 21-22 червня 2019 р. Львів, 2019. С. 85–88. (Дисертантом проведено дослідження швидкості формування резистентності до дії ЕХВ у клінічних штамів мікроорганізмів).

24. Швидкість формування резистентності у клінічних штамів грибів роду *Candida* до дії екстракту хмелю вуглекислотного / Казмірчук В. В., Невмержицький В. В., Моїсеєнко Т. М., Ляшенко М. І., Проценко Л. В.,

Шатило В. Й., Сорокоумова Л. К., Волянський Д. Л., Мельник А. Л., Панченко Л. О. Мікробіологічні читання пам'яті професора Юрія Леонідовича Волянського : матеріали науково-практичної конференції, 12 лютого 2020 р. Харків, 2020. С. 89. (Дисертантом проведено дослідження швидкості формування резистентності до дії ЕХВ у клінічних штамів грибів роду *Candida*).

25. Розробка нового протимікробного засобу на основі екстракту хмелю вуглекислотного для місцевого лікування інфікованих ран та опіків / Мінухін В. В., Невмержицький В. В., Частій Т. В., Моїсеєнко Т. М., Радченко О. О., Проценко Л. В., Довга І. М., Поволокіна Г. В., Ляшенко М. І., Сорокоумов В. П., Казмірчук В. В. Другий національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини, присвячений 175-річчю з дня народження І. І. Мечникова : науково-практична конференція з міжнародною участю, 16-17 травня 2020 року. Харків, 2020. С. 65–67. (Дисертантом проведено дослідження протимікробної активності мазевих композицій з ЕХВ щодо клінічних штамів мікроорганізмів).

АНОТАЦІЯ

Невмержицький В. В. Протимікробні властивості нових мазевих композицій на основі екстракту хмелю вуглекислотного. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія. – Державна установа "Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України", Харків, 2021.

У дисертаційній роботі на основі результатів експериментальних досліджень та їх теоретичних узагальнень вирішено наукове завдання розробки протимікробного засобу для лікування інфікованих ран. Проведено мікробіологічне обґрунтування біобезпечності екстракту хмелю вуглекислотного (ЕХВ) та ефективності протимікробні дії нової мазевої композиції на основі ЕХВ та допоміжних речовин відносно домінуючих збудників ранової інфекції.

Вперше на референтних тест-штамах мікроорганізмів охарактеризовано протимікробну активність ЕХВ за показниками МІК, МБК та МФК. Вперше доведено повільне формування резистентності до дії ЕХВ у клінічних штамів *S. aureus* та *P. aeruginosa*. Пріоритетними є результати досліджень цитотоксичності ЕХВ на лінійних культурах епітеліальних клітин (Нер-2) та фібробластів (М-19) людини, які показали низький рівень цитотоксичної дії ЕХВ на еукаріотичні клітини.

Вперше розроблено вісім експериментальних зразків мазевих композицій з ЕХВ та допоміжними речовинами в різних концентраціях. Мазеві композиції повністю відповідають чинним вимогам ДФУ 2 до м'яких лікарських форм.

За результатами мікробіологічного скринінгу на референтних тест-штамах мікроорганізмів встановлена найвища протимікробна активність зразку

мазевий композиції № 8. Доведено, що оптимальний склад нової мазевий композиції з ЕХВ перевершує «Календули мазь» за протимікробною активністю стосовно клінічних штамів домінуючих різновидів збудників ранової інфекції.

Ключові слова: мікроорганізми, екстракт хмелю вуглекислотного, протимікробна активність, цитотоксичність, нові мазеві композиції.

АННОТАЦІЯ

Невмержицкий В. В. Противомикробные свойства новых мазевых композиций на основе экстракта хмеля углекислотного. - На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.00.07 – микробиология. – Государственное учреждение "Институт микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова Национальной академии медицинских наук Украины", Харьков, 2021.

В диссертационной работе на основе результатов экспериментальных исследований и их теоретических обобщений решена научная задача разработки противомикробного средства для лечения инфицированных ран. Проведено микробиологическое обоснование биобезопасности экстракта хмеля углекислотного (ЕХВ) и эффективности противомикробного действия новой мазевой композиции на основе ЕХВ и вспомогательных веществ относительно доминирующих возбудителей раневой инфекции.

Впервые на референтных тест-штаммах микроорганизмов охарактеризована противомикробная активность ЕХВ по показателям МИК, МБК и МФК. Впервые доказано медленное формирование резистентности к действию ЕХВ у клинических штаммов *S. aureus* и *P. aeruginosa*. Приоритетными являются результаты исследований цитотоксичности ЕХВ на линейных культурах эпителиальных клеток (Нер-2) и фибробластов (М-19) человека, которые показали низкий уровень цитотоксического действия ЕХВ на эукариотические клетки.

Впервые разработаны восемь экспериментальных образцов мазевых композиций с ЕХВ и вспомогательными веществами в различных концентрациях. Мазевые композиции полностью соответствуют действующим требованиям ГФУ 2 к мягким лекарственным формам.

По результатам микробиологического скрининга на референтных тест-штаммах микроорганизмов установлена наиболее высокая противомикробная активность у образца мазевой композиции № 8. Доказано, что оптимальный состав новой мазевой композиции с ЕХВ превосходит "Мазь календулы" по противомикробной активности в отношении клинических штаммов доминирующих видов возбудителей раневой инфекции.

Ключевые слова: микроорганизмы, экстракт хмеля углекислотного, противомикробная активность, цитотоксичность, новые мазевые композиции.

ANNOTATION

Nevmerzhytskyi V. V. Antimicrobial properties of new ointment compositions based on hop CO₂ extract. – As a manuscript.

Thesis for receiving Candidate of Medical Science Degree in the specialty 03.00.07 - Microbiology. – State Institution "I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv, 2021.

Dissertation work is devoted to the actual problem - microbiological substantiation of development of a new ointment composition on the basis of hop CO₂ extract to increase the effectiveness of treatment of infected wounds.

The antimicrobial activity of the hop CO₂ extract was characterised for the first time in terms of minimal inhibitory concentration (MIC), minimal bactericidal concentration (MBC) and minimal fungicidal concentration (MFC) on test strains of Gram-positive (*S. aureus* ATCC 25923, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *B. cereus* ATCC 10702) and Gram-negative (*E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *P. aeruginosa* ATCC 27853) bacteria and fungi *C. albicans* ATCC 885-653. The MIC of hop CO₂ extract for Gram-positive bacteria has been shown to be between 1.69 and 2.05 mg/ml (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *B. cereus*), for Gram-negative – from 2,15-2,26 (*E. coli*, *K. pneumoniae*) to 3,40 mg/ml (*P. aeruginosa*), whereas the MIC of hop CO₂ extract for *C. albicans* reached 4.15 mg/ml. A similar pattern of hop CO₂ extract action was detected for the MIC index, which ranged for bacteria from 3.38 to 7.14 mg/ml, and the fungicidal effect (MFC) of hop CO₂ extract was observed when its concentration was increased almost twofold relative to the MIC and amounted to 8.53 mg/ml for *C. albicans*.

For the first time the dynamics resistance formation to hop CO₂ extract was characterized, which states that the resistance in all investigated cultures of *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* is formed quite slowly. A gradual increase in resistance was observed from 5 to 20 passages with an increase in MIC for bacteria in 3-8, and for fungi in 4 times. More intensive formation of the acquired resistance was observed from 20 to 30 passages with reaching the final level of MIC (median) for *S. aureus* – 11.83, *P. aeruginosa* – 45.3 and *C. albicans* – 53.95 mg/ml.

The cytotoxic effect of hop CO₂ extract on cultures of transplanted human laryngeal adenocarcinoma epithelial cell lines (Hep-2) and human diploid fibroblasts (M-19) was studied for the first time. It was found that on the Hep-2 and M-19 cell lines, the initial cytotoxic effects induce hop CO₂ extract concentrations ≥ 5.0 and ≥ 10.0 mg / ml with the corresponding CC₅₀ values of 28.7 and 77.3 mg / ml. In this case, taking into account the MIC hop CO₂ extract for microorganisms of different taxonomic groups, the value of its SI ranged from 6.9 to 45.7 with the highest level of 17.0 and 45.7 for *S. aureus* ATCC 25923 and the lowest 6.9 and 18, 6 for *C. albicans* ATCC 885-653.

Eight experimental samples of ointment compositions with hop CO₂ extract and excipients in different concentrations were developed for the first time. The mass fraction of hop CO₂ extract in the samples ranged from 1.0 to 5.0%. It was found that according to organoleptic characteristics all ointment compositions fully comply with

the requirements of GFU 2.0 to soft medicinal forms and rules of production and quality control of non-sterile medicinal products in pharmacies, regulated by the orders of the Ministry of Health of Ukraine from 17.10.2012. 812 and from 01.07.2015 № 398 and are characterized by: homogeneity, yellow-green color, characteristic hop odour, Ph = 6.0-7.0, structural viscosity 7.15 - 54.83 Pa • s, osmotic activity 65% and thermal stability.

The highest levels of antimicrobial activity were found in Compositions №№ 7 and 8, the significant difference in the quantitative composition of which was an increase in the concentration of hop CO₂ extract to 3.0 and 5.0 wt%, respectively ($U_{\phi} \leq U_{st}$ while $p=0.05$). At the same time, high sensitivity to the action of compositions № 7 and 8 was established in the strains *S. aureus* ATCC 25923, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *E. coli* ATCC 25922 and *K. pneumoniae* ATCC 13883 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 in composition № 8, moderate - in other reference microorganisms, including *C. albicans* ATCC 885-653. According to the results of comparison of the sum of ranks (Mann-Whitney U-criterion) diameters of growth retardation zones of all reference microbial strains under the action of comparable compositions №№ 7 and 8, the sample of ointment composition with hop CO₂ extract № 8 was determined as the most promising ($U_{\phi} \leq U_{st}$ while $p=0,05$).

A comparative study of the antimicrobial action of the sample ointment composition with hop CO₂ extract № 8 and "Caledulae unguentum" against thirty clinical strains of the dominant species of pathogens of wound infection for the first time showed that the new sample ointment composition is characterized by higher antimicrobial activity against all the tested strains: *A. baumannii*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *C. perfringens*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *P. vulgaris*, *B. subtilis*, *C. albicans* significantly ($p < 0.05$) exceed the indicators of the comparison drug.

Key words: wound infection agents, hop CO₂ extract, antimicrobial activity, cytotoxicity, new ointment composition.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАК

- ЕХВ – екстракт хмелю вуглекислотного
- ІС – індекс селективності
- КУО – колонієутворюючі одиниці
- МІК – мінімальна інгібуюча концентрація
- МБК – мінімальна бактерицидна концентрація
- МТК – мінімальна токсична концентрація
- МФК – мінімальна фунгіцидна концентрація