

Міністерство охорони здоров'я України  
Національний фармацевтичний університет

ОНИЦУК ЛЮДМИЛА ВАЛЕРІЇВНА

УДК 615.012:615.276:615.28:57.084

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ СТВОРЕННЯ ЛІКАРСЬКОГО  
ПРЕПАРАТУ ДЛЯ ІНТРАВАГІНАЛЬНОГО ЗАСТОСУВАННЯ  
З ПРОТИЗАПАЛЬНОЮ ТА ПРОТИМІКРОБНОЮ АКТИВНІСТЮ**

14.03.05 – фармакологія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата фармацевтичних наук

Харків – 2020

### **Дисертацією є рукопис.**

Робота виконана на кафедрі фармацевтичної, біологічної та токсикологічної хімії Національного медичного університету імені О. О. Богомольця МОЗ України, м. Київ.

**Науковий керівник:** доктор медичних наук, професор,  
заслужений діяч науки і техніки України  
НІЖЕНКОВСЬКА Ірина Володимирівна,  
Національний медичний університет  
імені О. О. Богомольця МОЗ України (м. Київ),  
завідувач кафедри фармацевтичної, біологічної та  
токсикологічної хімії

**Офіційні опоненти:** доктор фармацевтичних наук, професор,  
заслужений діяч науки і техніки України  
ЯКОВЛЄВА Лариса Василівна,  
Національний фармацевтичний університет (м. Харків),  
професор кафедри фармацевтичного менеджменту та  
маркетингу

доктор медичних наук,  
ВРИНЧАНУ Ніна Олексіївна,  
ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»,  
завідувач лабораторії фармакології протимікробних засобів

Захист відбудеться «\_\_» лютого 2021 р. о 12.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.03 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Валентинівська, 4.

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

Автореферат розісланий «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 р.

Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради  
доктор фармацевтичних наук, професор

К. Г. Щокіна

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Збереження репродуктивного здоров'я є невід'ємною складовою частиною здоров'я нації і має стратегічне значення для забезпечення сталого розвитку суспільства (WHO, 2020). Серед причин порушень діяльності репродуктивної системи у жінок запальні захворювання органів малого тазу посідають чільне місце і є значною медико-соціальною та економічною проблемою в усьому світі (B. Das, 2016), оскільки складають (55–70) % в структурі даної захворюваності. Забезпечення репродуктивного здоров'я на глобальному рівні визначене ВООЗ як пріоритетний напрямок відповідно до Резолюції Всесвітньої Асамблеї ООН з охорони здоров'я (WHO, 2018).

Запальні захворювання статевих органів спостерігаються у майже 60 % жінок дітородного віку і часто характеризуються латентним перебігом, що зумовлює труднощі своєчасної діагностики та хронізацію патологічних процесів і може призводити до безпліддя (38,9 %), порушення менструальної функції (42,3 %), полікістозу яєчників (45,7 %) (О. В. Ромащенко, 2016) та інших патологічних станів, які впливають на якість життя жінки (D. Zhang, 2017).

Не дивлячись на наявність значного арсеналу протимікробних і протизапальних лікарських засобів на ринку України, розповсюдженість вагінітів змішаної етіології потребує розробки нових ефективних та безпечних комбінованих лікарських препаратів, здатних впливати на всі ланки патологічного процесу. Вищезазначене стало підставою для вивчення ефективності та нешкідливості нової комбінації лікарських речовин у вигляді песаріїв з перспективою їх подальшого клінічного вивчення і застосування в якості потенційного лікарського засобу для лікування вагінітів різної етіології.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.**

Дисертація виконана в рамках науково-дослідної роботи кафедри фармацевтичної, біологічної та токсикологічної хімії Національного медичного університету імені О. О. Богомольця за темою: «Експериментальне обґрунтування створення нового лікарського засобу з протимікробною та протизапальною активністю», державний реєстраційний номер 0115U000907. Дисертант є відповідальним виконавцем зазначеної теми.

**Мета і завдання дослідження.** *Мета роботи* – експериментально обґрунтувати доцільність розробки ефективного і безпечного комбінованого лікарського препарату для інтравагінального введення з протимікробною та протизапальною активністю.

Для досягнення поставленої мети були поставлені такі завдання:

1. В дослідях *in vitro* провести скринінг антимікробної активності кожного компоненту комбінації, встановити оптимальні концентрації досліджуваних компонентів та визначити комбінацію-лідер.

2. Дослідити гостру токсичність комбінації-лідера при внутрішньошлунковому (в/шл) та інтравагінальному (i/vag) шляхах введення мишам та щурам із визначенням LD<sub>50</sub> та дослідити хронічну токсичність при пероральному та інтравагінальному введенні щурам та місцевоподразнюючу дію.

3. Оцінити вплив нової комбінації-лідера на морфологічну будову, імунологічні показники та жирнокислотний спектр ліпідів тканини піхви щурів за умов експериментального моделювання травматичного та асептичного вагінітів у щурів-самиць.

4. Вивчити вплив комбінації-лідера на показники загальної імунологічної відповіді мишей при формуванні вагініту змішаної етіології, викликаного *S. aureus* та *C. albicans*.

5. Дослідити антибіоплівкову активність комбінації-лідера щодо золотистого стафілококу, дріжджоподібних грибів та мікробних асоціацій, сформованих *S. aureus* та *C. albicans*.

*Об'єкт дослідження:* фармакологічна корекція вагінітів.

*Предмет дослідження:* протизапальна та протимікробна активність нового комбінованого препарату в умовах експериментальних вагінітів різної етіології.

**Методи дослідження.** Фармакологічні, мікробіологічні (вивчення протимікробних властивостей та антибіоплівкової активності комбінованих зразків *in vitro*), токсикологічні (дослідження гострої та хронічної токсичності), біохімічні (дослідження активності аспартатамінотрансферази (АсАТ), аланінамінотрансферази (АлАТ), вмісту загального білку, альбуміну, креатиніну, холестеролу, глюкози в сироватці крові, жирнокислотного (ЖК) спектру ліпідів у тканині піхви та сироватці крові), гістологічні, імунологічні, статистичні.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Комбінація фармакологічно активних речовин, що мають протимікробну та протизапальну дію у формі песаріїв, створена вперше і призначена для лікування вагінітів при інтравагінальному введенні (і/ваг). Місцеву дію забезпечують такі відомі активні субстанції як метронідазол, клотримазол та ібупрофен. Вперше доведено, що в комбінації антимікробні субстанції в певних дозах не виявляють негативного впливу на специфічну антимікробну дію один одного. Вказана властивість була використана для створення нового комбінованого лікарського засобу, якому була надана умовна назва – МКІ-4 (метронідазол 100 мг, клотримазол 400 мг та ібупрофен 80 мг).

За токсичністю комбінація-лідер МКІ-4 відноситься до V класу «практично нетоксичні речовини» (А. В. Стефанов, 2002) при в/шл введенні. За умови тривалого застосування МКІ-4 визначено відсутність її токсичного впливу на поведінкові реакції, масу тіла та внутрішніх органів, показники функціонального стану печінки, нирок експериментальних тварин.

Проведені дослідження дозволили встановити, що нова комбінація виявляє протизапальну, протимікробну та антибіоплівкову активність. Вказані властивості підтверджені позитивним впливом на відновлення епітеліальної пластинки піхви, зменшенням суми балів, що характеризують ступінь патологічного процесу та нормалізацією функціональних показників лейкоцитів периферичної крові, а саме їх перерозподіл, ФІ, ФЧ при моделюванні ТВ та АВ у щурів.

Доведено наявність терапевтичної дії песаріїв МКІ-4 при введенні їх на тлі ВЗЕ (*S. aureus* та *C. albicans*), що підтверджувалось нормалізацією показників імунної системи (антитілозалежною та кооперативною ЦТАЛф та ЦТАМф, рівнем ЦІК, ЛЗС) та відновленням ЖК спектру тканини піхви, сироватки крові після щоденного введення МКІ-4 (53 мг/кг) протягом 5 діб.

Встановлено наявність інгібувальних властивостей МКІ-4 щодо формування біоплівки монокультур аеробних бактерій та бактеріально-грибкових асоціацій.

Новизна підтверджена 2 патентами України на корисну модель.

**Практичне значення отриманих результатів.** Отримані експериментальні дані дозволили обґрунтувати доцільність розробки нового комбінованого лікарського препарату у вигляді песаріїв для інтравагінального введення з протимікробними та протизапальними властивостями та можуть стати підґрунтям для проведення подальших доклінічних та клінічних досліджень комбінації-лідера МКІ-4.

Запропоновано спосіб оцінки змін ліпідного метаболізму при лікуванні експериментального вагініту у щурів (патент України на корисну модель № 144453, 2020 р.); спосіб оцінки змін ліпідного обміну при лікуванні травматичного вагініту у щурів (патент України на корисну модель № 144452, 2020 р.). Результати роботи впроваджені в науково-дослідну роботу ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О. М. Лук'янової НАМН України» (протокол № 14 від 23.01.2020 р.), Науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини Національного медичного університету імені О. О. Богомольця (протокол № 1 від 11.03.2020 р.), Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (протокол № 8 від 01.06.2020 р.), Інституту гігієни та екології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця (протокол № 4 від 04.03.2020 р.), кафедри фармацевтичної технології і біофармації НМАПО імені П. Л. Шупика, кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова (протокол № 8 від 17.01.2020 р.).

**Особистий внесок здобувача.** Разом з науковим керівником визначені мета та задачі дослідження, розроблені методичні підходи для вибору методів та моделей для виконання експериментальної частини дисертації. У комплексному дослідженні, над яким працював творчий колектив співавторів публікацій, дисертант самостійно провів патентно-інформаційний пошук, аналіз та узагальнення літературних даних за темою дисертації, виконав експериментальну частину дослідження з подальшим оформленням результатів у вигляді таблиць, рисунків, провів статистичну обробку, аналіз отриманих результатів та сформулював висновки дисертації. Всі результати встановлено автором особисто або за безпосередньої участі. Особистий внесок у кожному дослідженні наведено у списку опублікованих праць за темою дисертації. Всі розділи дисертаційної роботи та автореферат написані автором самостійно.

Біохімічні дослідження проведені в НДІ експериментальної та клінічної медицини НМУ імені О. О. Богомольця (директор – проф. Л. В. Натрус) за консультації канд. тех. наук Т. С. Брюзгіної, морфологічні – за консультативної допомоги доцента кафедри гістології та ембріології, канд. біол. наук С. І. Савоська. Дослідження стану імунної відповіді проведено у відділі біохімії вітамінів та коензимів (завідувач – проф. М. М. Великий) Інституту біохімії імені О. В. Палладіна НАН України за консультативної допомоги канд. біол. наук М. М. Гузика. Дисертант вдячний всім науковцям за методичну та консультативну допомогу.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи викладені та обговорені на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях, конгресах та з'їздах: «Молодая фармация – потенциал будущего», Всероссийская

наука конференция студентов и аспирантов с международным участием (м. Санкт-Петербург, 14–15 квітня 2014 р.); III Міжнародна науково-практична конференція «Новітні досягнення біотехнології та нанофармакології» (м. Київ, 22-23 жовтня 2015 р.); Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених та студентів «Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я» (м. Запоріжжя, 26–27 березня 2015 р.); Науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 100-річчю з дня народження С. І. Корхова «Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини» (для студентів та молодих вчених) (м. Одеса, 19–20 квітня 2018 р.); II Міжнародна науково-практична конференція «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (м. Харків, 28–29 березня 2018 р.); Міжнародна науково-практична конференція: «Актуальні питання в контексті розвитку сучасних наук» (Німеччина, м. Дрезден, 23 січня 2019 р.); III Міжнародна науково-практична конференція «Ліки-людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (м. Харків, 14–15 березня 2019 р.); XXIII міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених (м. Тернопіль, 15–17 квітня 2019 р.); International Scientific Conference «Medicine under the modern conditions of integration development of European countries» (Польща, м. Люблін, 10–11 травня 2019 р.).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 19 наукових праць: 8 статей, серед яких 5 – у наукових профільних виданнях, рекомендованих МОН України, 3 – у зарубіжних наукових виданнях, 1 з них у виданні Scopus, 2 патенти України на корисну модель, 9 тез доповідей.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 236 сторінках комп'ютерного друку та складається з анотацій українською та англійською мовами, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи дослідження», 4 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел (містить 292 літературних посилання, з яких 59 – кирилицею та 233 – латиною), додатків. Робота ілюстрована 31 таблицею та 40 рисунками.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали та методи дослідження.** Експериментальні зразки песаріїв під шифрами: ОД, МЕТ, КЛ, ІБП, МК-1 – МК-15, МКІ-1 – МКІ-4 для наших досліджень були виготовлені на кафедрі фармацевтичної технології і біофармації Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика під керівництвом професора Л. Л. Давтян із субстанцій клотримазолу, ібупрофену (ПАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод», Україна) та метронідазолу (ТОВ «Юрія-Фарм», Україна), які є складовими песаріїв (метронідазол та клотримазол у діапазоні концентрацій (100–500) мг, ібупрофен – (20–80) мг. В якості основи для песаріїв було обрано вітепсол – до 4000 мг). Для проведення контролю якості експериментальних зразків дотримувалися методик, наведених у ДФУ 2001 I вид., розділи «М'які лікарські засоби для місцевого застосування» та Доповненні 2 ДФУ 2008 «Лікарські засоби для вагінального застосування».

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

<p>I етап Скринінг протимікробних, протизапальних властивостей та визначення комбінації-лідера</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• вивчення протимікробних властивостей експериментальних зразків песаріїв: МЕТ, КЛ, ІБП, О, МК-1 – МК-15, МКІ-1 – МКІ-4, щодо дріжджоподібних грибів, факультативно облигатних та анаеробних мікроорганізмів;</li> <li>• вивчення протизапальних властивостей на моделі асептичних шкірних виразок та визначення комбінації-лідера за дозуваннями;</li> </ul>
<p>II етап Дослідження токсичності комбінації-лідера</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• дослідження гострої токсичності та визначення середньолетальної дози комбінації-лідера МКІ-4 при в/шл та і/ваг введенні у мишей та щурів;</li> <li>• вивчення впливу МКІ-4 на параметри хронічної токсичності при і/ваг введенні у щурів;</li> <li>• вивчення місцевопідразнюючих властивостей комбінації-лідера МКІ - 4 при нашкірному нанесенні та і/ваг введенні кролям;</li> </ul>
<p>III етап Вивчення фармакологічної активності комбінації-лідера МКІ-4</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• дослідження протизапальної активності комбінації МКІ-4 на моделі карагенінового набряку у щурів;</li> <li>• дослідження впливу МКІ-4 на морфологічну структуру, ФА лейкоцитів, ЖК склад та стан вагіни при моделюванні ТВ;</li> <li>• дослідження впливу МКІ-4 на морфологічну структуру вагіни, ФА лейкоцитів та ЖК склад при моделюванні АВ;</li> <li>• дослідження впливу МКІ - 4 на запальний процес за умов індукованого ВЗЕ у мишей;</li> </ul>
<p>IV етап Дослідження антибіоплівкової активності МКІ-4</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• дослідження антибіоплівкової активності комбінованих песаріїв МКІ-4.</li> </ul>

Рис. 1 – Дизайн експериментальних досліджень

В роботі використано 3 еталонних тест-штамів мікроорганізмів. Бактерії: грампозитивні: *S. aureus* ATCC 6538, *C. sporogenes* ATCC 19404. Гриби: дріжджоподібні: *C. albicans* ATCC 10231. В якості поживних середовищ використовували бульйон та агар Мюллера-Хінтон, триптон-соевий бульйон, агар та бульйон Сабуро, тіогліколеве середовище, в залежності від виду мікроорганізму (Державна Фармакопея України, 2015). Для ідентифікації штамів грибів було використано хромогенне середовище (Chrom ID™; Біомерьє, Франція), бактерій – стандартну систему API® (стрипи; Біомерьє, Франція), манітно-сольовий агар, тіогліколеве середовище з резазурином. Для вирощування біоплівок грибів роду *Candida* використовували рідке поживне середовище RPMI 1640.

Дослідження проведені на штаммах мікроорганізмів, які отримані з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України.

Дослідження *in vivo* виконували на 201 щурі лінії Вістар, 30 кролях породи Шиншила, 195 білих нелінійних мишах. Догляд за тваринами та їх евтаназію здійснювали відповідно до принципів Європейської конвенції із захисту лабораторних тварин (Страсбург, 1986 р.), Закону України від 21.02.2006 р. № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», Наказу Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України від 01.03.2012 р. № 249 «Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах». Дотримання біоетичних норм при проведенні експериментальних досліджень на тваринах підтверджено Комісією з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень НМУ імені О. О. Богомольця (протокол № 122 від 29.05.2019).

*Вивчення протимікробних властивостей експериментальних зразків песаріїв: МЕТ, КЛ, ІБП, О, МК-1 – МК-15, МКІ-1 – МКІ-4, щодо дріжджоподібних грибів, факультативно obligатних мікроорганізмів та визначення комбінації-лідера проводили in vitro* методом серійних мікро- та макророзведень у рідких поживних середовищах за загальноприйнятими методиками (Н. А. Семина, 2004) із визначенням мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). За МІК приймали максимальне розведення препарату, при якому візуально не реєструвався ріст мікроорганізмів протягом визначеного умовами експерименту часу. Антимікробну дію песаріїв досліджували згідно з ДФУ.

*Визначення здатності досліджуваних тест-штамів мікроорганізмів до плівкоутворення* проводили в полістиролових планшетах за стандартною методикою O'Toole (G. O'Toole, 1999). Вимірювання оптичної щільності проводили на спектрофотометрі для мікропланшет «Absorbance Microplate Reader ELx800» при довжині хвилі 630 нм. Оцінку результатів здійснювали відповідно до критеріїв, розроблених Stepanovic (S. Stepanovic, 2007). Кінцева концентрація досліджуваних речовин складала: клотримазолу – 5000 мкг/мл, 500 мкг/мл та 50 мкг/мл, метронідазолу – 1250 мкг/мл, 125 мкг/мл та 12,5 мкг/мл, ібупрофену – 1000 мкг/мл, 100 мкг/мл та 10 мкг/мл.

*Вивчення протизапальних властивостей та визначення концентрації ібупрофену* на моделі стандартних шкірних виразок проводили на білих нелінійних щурах. Показник площі (S) рани (см<sup>2</sup>) вимірювали планіметрично, за ним розраховували відсоток активності досліджуваних ЛЗ відносно нелікованих тварин. Крім того було досліджено показник загоювання ран (А. В. Стефанов, 2002).

*Дослідження гострої токсичності та LD<sub>50</sub> комбінації-лідера МКІ-4* при в/шл шляху введення дослідження проводили на мишах-самицях лінії Balb/c. Комбінацію МКІ-4 вводили у дозах від 0,24 мг/тварину до 245,74 мг/тварину (від 10 мг/кг до 10000 мг/кг) за допомогою зонду (шприц на 1 мл, градуйований з ціною поділки 10 мкл, VogMark, Польща). Для перевірки токсичної дії комбінації АФІ, що входять до складу песаріїв, мишам одноразово в/шл вводили в дозах: 942 мг/кг, 4710 мг/кг, 9420 мг/кг з урахуванням лімітуючого показника при вказаному шляху введення 1/10, 1/2, LD<sub>50</sub>. Дослідження гострої токсичності МКІ-4 при і/ваг введенні у щурів-самиць. Песарії розплавляли на водяній бані до (36–37,5) °С і вводили у піхву за



допомогою вагінального катетера. Після розплавлення песаріїв було визначено, що 1 мл песаріїв важить 942 мг. Контрольній групі щурів вводили попередньо розплавлену основу песаріїв.

*Дослідження параметрів хронічної токсичності МКІ-4 при і/ваг введенні* проводили на статевозрілих білих нелінійних щурах-самицях віком 2,5-3,0 місяці. Введення МКІ-4 тваринам проводили у 3 рівнях доз: 9,42 мг/кг, 94,2 мг/кг, 942 мг/кг щоденно разово. Протягом 3 місяців спостерігали за виживаністю, зовнішнім виглядом, станом шерсті та слизових оболонок, поведінкою, споживанням корму та води, зміною маси тіла. Оцінку гематологічних маркерів проводили за допомогою гематологічного аналізатора MicroCC-20 Plus («НТІ», США). В периферичній крові визначали рівень гемоглобіну, кількість еритроцитів, тромбоцитів, лейкоцитів, лімфоцитів, моноцитів, еозинофілів, нейтрофілів та показник ШОЕ. Кров відбирали з бічних вен хвоста щурів, дослідження біохімічних показників сироватки крові тварин проводили після евтаназії через 3 місяці методом спектрофотометрії для оцінки функціонального стану печінки, рівня білкового, вуглеводного та жирового обмінів, а також активності АсАТ та АлАТ з використанням біохімічного аналізатора Biochem SA («НТІ», США) та стандартних наборів реактивів («High Technology, Inc.», США).

*Вивчення місцевоподразнюючих властивостей комбінації-лідера МКІ-4.* Місцевоподразнюючий вплив песаріїв вивчали на кролях за умов одноразового та багаторазового (протягом 14 днів) щоденного нашкірного нанесення у дозі 0,5 г та і/ваг введення об'ємом 1 мл. Відповідні ділянки шкіри оцінювали за шкалою Draize (В. М. Коваленко, 2007) за наявністю та вираженістю еритеми, струпа, набряку та некрозу.

*Вивчення протизапальної активності на моделі карагенінового набряку стопи щурів.* У експериментальних тварин перед введенням карагеніну визначали об'єм задньої кінцівки щурів. Досліджувані зразки наносили нашкірно одноразово за 1 год до відтворення патології у дозі 20 мг/см<sup>2</sup>. Асептичне ексудативне запалення викликали шляхом субплантарного введення в праву задню кінцівку 20 мкл 0,1 % розчину карагеніну (А. В. Стефанов, 2002).

Модель ТВ тваринам відтворювали за допомогою маніпуляцій, що спрямовані на механічне пошкодження слизової оболонки піхви і розвитку місцевого запалення (С. М. Дроговоз та співавт., 2003). Моделювання АВ відтворювали введенням у піхву тампону, зрошеного 10 % розчином азотнокислого срібла та його експозицією протягом 5 хв (Л. М. Малоштан та співавт., 2011). Індукований ВЗЕ у мишей формували шляхом зрошення вагіни розчином ампіоксу та пероральним його введенням із розрахунку 0,004 г/тварину протягом 5 днів. Після індукції вагінозу до вагіни вносили суспензію мікроорганізмів *S.aureus* та *C. albicans* (Н. П. Сачивкіна, 2010).

При моделюванні вагінітів різної етіології тварин розподіляли на 5 груп: 1 – інтактний контроль; 2 – контрольна патологія (ТВ або АВ або ВЗЕ); 3 – основа песаріїв; 4 – МКІ-4; 5 – ПП (*Нео-Пенотран*<sup>®</sup>, «ЕкселтісХелске С.Л.», Іспанія). Дозу досліджуваних препаратів розраховували з використанням коефіцієнтів перерахунку за Ю. Р. Риболовлєвим (Ю. Р. Риболовлєв, 1979).

Матеріалом дослідження впливу МКІ-4 на морфологічну структуру вагіни були зразки піхви контрольної і дослідних груп щурів. Мікропрепарати досліджували за допомогою мікроскопу Olympus BX 51. Морфометричний аналіз проведено з використанням програмного забезпечення CarlZeiss (AxioVision SE64 Rel.4.9.1) при збільшенні  $\times 400$ . Кількісна оцінка полягала у вимірюванні товщини слизової оболонки (мкм) за двома точками. Для оцінки загальноморфологічних змін органу проведено аналіз змін за критеріями: набряк слизової оболонки, гіперемія судин слизової оболонки, крововиливи, лейкоцитарні інфільтрати (нейтрофіли, моноцити). Кожний з критеріїв оцінювали у балах: 1 бал – зміни виявлені у  $< 25\%$ , 2 бали – у  $(25-50)\%$ , 3 бали – у  $(50-75)\%$  від загальної площі зразка вагіни. Загальна кількість балів кожного досліджуваного зразка складала суму балів за кожним критерієм.

Дослідження впливу МКІ-4 на фагоцитарну активність лейкоцитів. Оцінку перерозподілу між різними популяціями лейкоцитів проводили з використанням двох параметрів протокового цитофлуориметру: за величиною прямого (FS, розмір клітин) та бічного світлорозсіювання (SS, гранулярність клітин). Відсоток фагоцитуючих клітин та поглинання макрофагами живих флуоресцентних бактерій у зразках було визначено з використанням флуоресцентних живих бактерій *Escherichia coli* за методикою (Н. Вікер, 2008). ЖК ліпідів у тканинах піхви та сироватці крові визначали за допомогою газової хроматографії. Газохроматографічний аналіз спектра ЖК ліпідів проводили на газовому хроматографі «Цвет-500», РФ з полум'яно-іонізаційним детектором в ізотермічному режимі (І. В. Ніженковська та співавт., 2015).

Функціональну активність клітин імунної системи ЦТАЛф, ЦТАМф, а також АЗЦ, ЦІК проводили за допомогою МТТ-методу на другу добу після останнього введення досліджуваних зразків (11-а доба експерименту) (О. С. Дворщенко, 2007).

#### *Методи статистичного аналізу.*

Експериментальні дані оброблено методами варіаційної статистики за допомогою спеціалізованих програм Excel 2007 (Microsoft Corp., США), Statistica 6.0 (StatSoft, США) та Origin Labversion 8.0. Дані подано у вигляді середнього арифметичного ( $M$ ) і стандартної похибки ( $m$ ). Для оцінки результатів досліджень та виявлення відмінностей використовували дисперсійний метод (ANOVA), критерій Ньюмена-Кейлса, U-критерій Вілкоксона-Манна-Уїтні, критерій Колмогорова-Смірнова, критерій Крускала-Уоліса (А. Петри, 2003). Результати морфометричного дослідження наведено у вигляді медіани ( $Me$ ) і квартильних інтервалів [ $Q1-Q3$ ].

**Результати досліджень та їх обговорення.** Результати дослідження антибактеріальної та антифунгальної дії клотримазолу показали доцільність його вмісту у песаріях у дозі 400 мг, збільшення вмісту до 500 мг/песарій не супроводжувалось зростанням антимікробної активності. Проведені скринінгові дослідження щодо антимікробної активності досліджуваних тест-зразків показали, що збільшення концентрації метронідазолу у песаріях (з 100 мг до 500 мг) не супроводжувалось підвищенням антибактеріальної дії, що свідчать про доцільність застосування метронідазолу у песаріях у дозі 100 мг.

При вивченні протизапальних властивостей ібупрофену в різних концентраціях (20 мг, 40 мг, 60 мг, 80 мг на песарій) на моделі стандартних шкірних виразок у

щурів було встановлено, що загоєння у тварин контрольної патології відбувалося на 17-й день. Песарії ІБП-4 із концентрацією ібупрофену 80 мг/песарій проявляли найвищу терапевтичну ефективність вже на 9-й день. Зразки ІБП-1 – ІБП-3 виявляли меншу активність щодо даної патології, про що свідчило загоєння лише на 11-15 добу лікування.

Дослідження трьохкомпонентного зразка песаріїв (метронідазол+клотримазол+ібупрофен) МКІ-4 не виявило змін діаметру зон затримки росту *S. albicans* ( $(13,08 \pm 0,53)$  мм –  $(13,75 \pm 0,25)$  мм) та *S. aureus* ( $(33,0 \pm 0,41)$  мм –  $(34,08 \pm 0,34)$  мм) порівняно з двокомпонентним МК-4 (метронідазол+клотримазол). Отже ібупрофен не справляв негативного впливу на антимікробну активність тест-зразка песаріїв.

Наступним етапом дослідження комбінації-лідера МКІ-4 було встановлення параметрів її токсичності. Гостру токсичність МКІ-4 вивчали за умов одноразового в/шл введення розплавленої маси в дозах: 942 мг/кг, 4710 мг/кг, 9420 мг/кг з урахуванням лімітуючого показника при вказаному шляху введення 1/10, 1/2, LD<sub>50</sub>. Встановлено, що МКІ-4 має LD<sub>50</sub> вищу за 5000 мг/кг та може бути віднесений до V класу токсичності «практично нетоксичні речовини» при в/шл введенні (А. В. Стефанов, 2002). Показано також, що досліджувана комбінація не спричиняла загибелі піддослідних тварин та не викликала змін в поведінці тварин.

Крім вищезначеного, для оцінки токсичного впливу МКІ-4 було обрано і/ваг шлях введення. Отримані дані свідчать, що після і/ваг введення в максимально допустимому об'ємі 1 мл (942 мг) на тварину, ознак інтоксикації не проявлялось: тварини залишалися активними, загальний стан та динаміка набору маси тіла були в межах норми. Загибелі тварин протягом експерименту не спостерігали.

Наступний етап експерименту був присвячений вивченню показників хронічної токсичності комбінації-лідера МКІ-4. Дослідження хронічної токсичності песаріїв МКІ-4 протягом 3-х місяців проводили на статевозрілих білих нелінійних щурах-самицях в дозах: 9,42 мг/кг, 94,2 мг/кг, 942 мг/кг і/ваг. Щоденне введення зразків МКІ-4 щурам-самицям не супроводжувалось відхиленнями у загальному стані та поведінці тварин в порівнянні з тваринами в інтактній групі. Загибелі тварин протягом означеного періоду не спостерігалося. Динаміка збільшення маси тіла, коефіцієнти маси внутрішніх органів, активність АсАТ та АлАТ, рівні загального білку, альбуміну, креатиніну, холестеролу, глюкози сироватки крові у тварин, яким вводили МКІ-4 в трьох досліджуваних дозах, свідчили про відсутність явних метаболічних порушень, токсичного впливу на білковий, вуглеводний та ліпідний обміни у експериментальних тварин при тривалому введенні песаріїв МКІ-4, що підтверджували і гістологічні дослідження печінки, нирок, серця та головного мозку.

Дослідження місцевоподразнюючої дії МКІ-4 при аплікації на шкіру кролів та і/ваг введенні свідчить про відсутність ознак еритеми, набряку чи некрозу протягом експерименту.

В якості моделі ексудативної фази запального процесу було обрано модель карагенінового набряку як загальноприйнятої в експериментальній фармакології. У даній серії дослідів песарії МКІ-4 вводили у дозі 53 мг/кг (за діючими речовинами), яка визначена у попередніх дослідженнях як умовно-терапевтична,

*Нео-Пенотран*<sup>®</sup> – у дозі 54 мг/кг, яку розраховували за методом Ю. Риболовлева. Через годину після введення карагеніну в групі тварин з контрольною патологією спостерігався розвиток набряку стопи, який поступово зростав і досягав максимуму на 2–4 год. Нанесення МКІ-4 за 1 год до введення карагеніну позначилось виразним пригніченням набряку на 2 год спостереження (-43,1 %,  $P < 0,05$ ). На 3-ю год антиексудативний ефект МКІ-4 досягав максимуму (-44,95 %,  $P < 0,05$ ) в порівнянні з патологією, в той час як ПП означений ефект не проявляв.

В подальших дослідженнях визначали фармакологічну активність МКІ-4 на моделях вагінітів.

Головними структурними проявами пошкодження за умов ТВ були набряк і локальна втрата епітеліальної вистилки, у рівній мірі зменшення щільності осередків гіперемії судин і крововиливів. Структурні прояви відновного процесу характеризувались проліферативними змінами в епітелії і збільшенням щільності фіброblastів у підслизовій основі, що є свідченням активації регенеративних процесів (рис. 2).

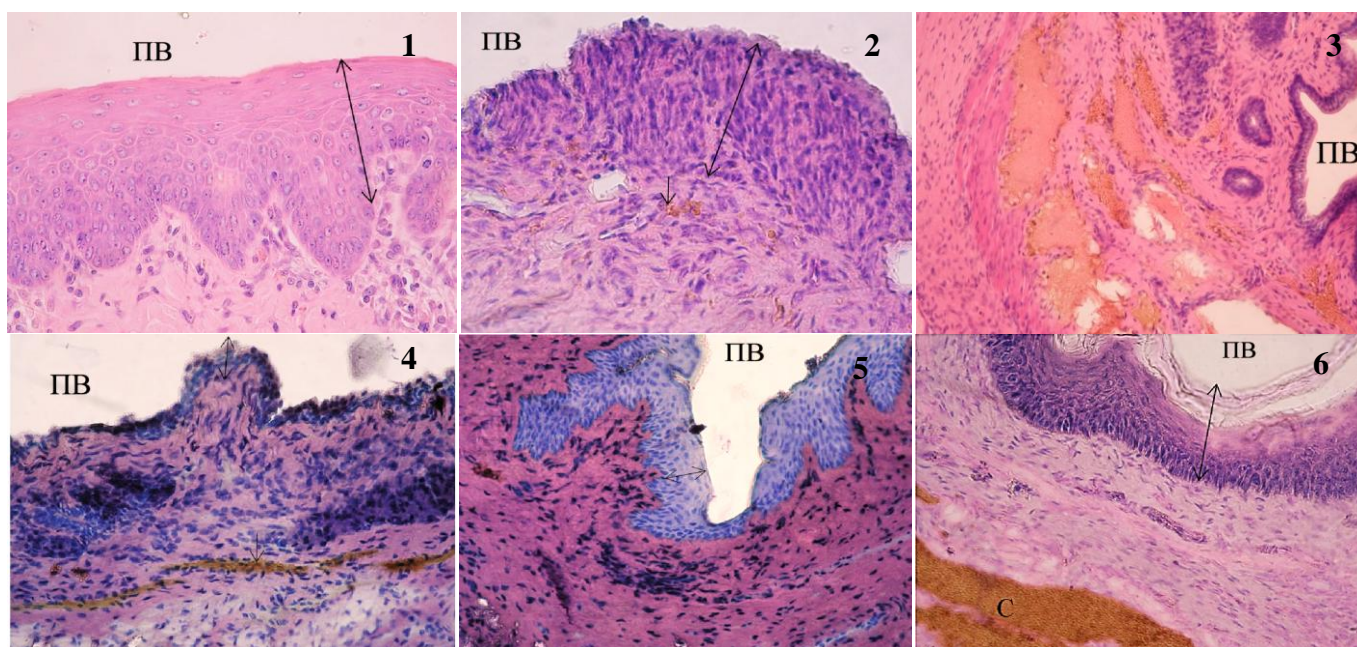


Рис. 2 – Вплив МКІ-4 на гістологічні структурні зміни піхви при ТВ. Гематоксилін з еозином,  $\times 400$

Примітка. 1 – інтактний контроль; 2, 3 – ТВ; 4 – основа песаріїв; 5 – МКІ-4; 6 – ПП; ПВ – просвіт вагіни; ← гемосидерин; ↔ товщина слизової оболонки.

Гістологічні дані свідчать про наявність протекторного впливу МКІ-4 на епітелій слизової оболонки. Морфометрично встановлено статистично значуще зменшення балів відповідно до виявлених структурних змін при введенні МКІ-4. Товщина епітелію збільшувалась в порівнянні з контрольною патологією на 97,8 %, але не досягала значень інтактного контролю (-34,6 %,  $P < 0,05$ ). Отримані результати свідчать про позитивний вплив МКІ-4 на морфологічну будову тканини піхви при моделюванні даної патології. При застосуванні ПП зменшення деструктивних змін

слизової виявлялися меншою мірою та не досягали значень інтактного контролю (в середньому менше на 85,1 %,  $P < 0,05$ ).

Оскільки запальні процеси в організмі супроводжуються змінами імунного статусу, подальші дослідження були присвячені модифікаціям імунної відповіді на моделювання запального процесу і можливій корекції їх МКІ-4. За умов ТВ були виявлені порушення у відсотковому співвідношенні лейкоцитів периферичної крові, а саме збільшення кількості гранулоцитів на 13 % та підвищення їх функціональної здатності продукувати АФК ( $(1454,96 \pm 190,53)$  ум. од., в інтактному контролі  $(946,61 \pm 56,80)$  ум. од.,  $P < 0,05$ ), що обумовлено активацією запального процесу. У тварин із ТВ фагоцитарна активність проявлялась підвищенням ФІ в 1,6 рази ( $P < 0,05$ ) та зниженням ФЧ на 19 % ( $P < 0,05$ ).

Введення МКІ-4 супроводжувалось нормалізацією функціональної здатності гранулоцитів продукувати АФК, збільшенням ФЧ на 27 % ( $P < 0,05$ ), зниженням ФІ у 1,34 рази ( $P < 0,05$ ) (рис. 3). Зміни в продукції АФК та ФА під впливом МКІ-4 можуть свідчити про покращення показників стану імунної системи при даній патології.

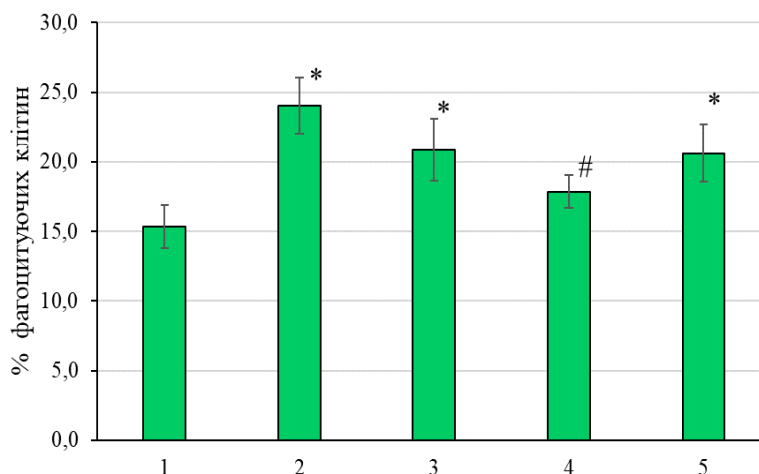


Рис. 3 – Фагоцитарний індекс лейкоцитів крові щурів при ТВ (n = 7)

Примітка 1. 1 – інтактний контроль; 2 – ТВ; 3 – ТВ+О; 4 – ТВ+МКІ-4; 5 – ТВ + ПП.

Примітка 2. \* $P < 0,05$  порівняно з інтактним контролем; #  $P < 0,05$  порівняно з ТВ.

Оскільки процес запалення супроводжується порушенням обміну ліпідів та зміною співвідношення насичених і ненасичених ЖК в тканинах (Silva Figueiredo, 2017), вивчення ЖК складу тканини піхви було інформативним щодо характеристики даного патологічного процесу. Аналіз ЖК співвідношення ліпідів при моделюванні ТВ у щурів-самиць продемонстрував збільшення суми ННЖК на 12 % ( $P < 0,05$ ) та зменшення на 11,7 % ( $P < 0,05$ ) суми НЖК, в той же час, ПНЖК збільшились на 16 % ( $P < 0,05$ ) у порівнянні із інтактним контролем переважно за рахунок зростання відносного вмісту арахідонової кислоти (до 11,3 %,  $P < 0,05$ ). При введенні МКІ-4 тваринам з ТВ спостерігалась нормалізація ЖК співвідношення та зменшення вмісту арахідонової ЖК в 3,2 рази ( $P < 0,05$ ), застосування ПП приводило до зменшення даного показника лише у 2 рази ( $P < 0,05$ ) у порівнянні з групою контрольної патології. Дані зміни можуть бути пов'язані з присутністю у комбінації ібупрофену, який пригнічує синтез простагландинів, простациклінів і лейкотрієнів із арахідонової кислоти (С. Gunaydin, 2018).



Подальші дослідження були присвячені впливу МКІ-4 на піхву щурів при моделюванні АВ. Морфологічними ознаками запалення при АВ були вогнищева або дифузно-вогнищева інфільтрація макрофагів і нейтрофілів. У групі тварин, яким вводили МКІ-4 на фоні АВ, епітелій у значній протяжності просвіту характеризувався багат шаровою будовою, в окремих ділянках відмічались осередки проліферації, що є ознакою активації відновних процесів. У підслизовій основі виявлено осередки гемосидерину, помірне кровонаповнення судин та інфільтрацію поодиноких лейкоцитів.

За допомогою морфометричних досліджень встановлено зменшення балів (у 2 рази) під впливом МКІ-4 відповідно до виявлених структурних змін в контрольній патології, за даних умов експерименту товщина епітелію вагіни збільшувалась на 73,8 % ( $P < 0,05$ ) і відповідала такій в інтактному контролі. Отже, захисна дія МКІ-4 при АВ на структурному рівні полягала у швидкому відторгненні та елімінації пошкодженого епітелію, активації відновного процесу (рис. 4).

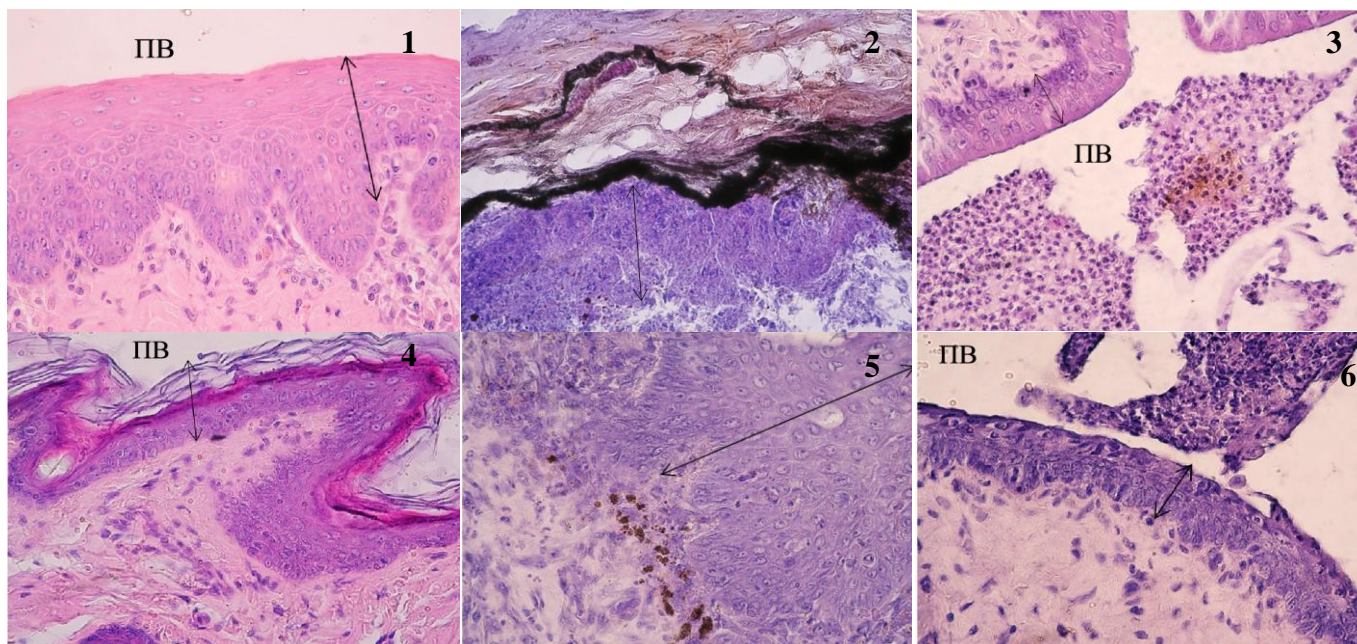


Рис. 4 – Вплив МКІ-4 на гістологічні структурні зміни піхви при АВ. Гематоксилін з еозинном,  $\times 400$

Примітка. 1 – інтактний контроль; 2 і 3 – АВ; 4 – основа песаріїв; 5 – МКІ-4; 6 – ПП; ПВ – просвіт вагіни;  $\leftrightarrow$  товщина слизової оболонки.

При використанні ПП зменшення деструктивних змін слизової оболонки виявлялися меншою мірою і не досягали значень інтактного контролю ( $-7,2\%$ ,  $P < 0,05$ ).

В подальших дослідженнях, за умов АВ були виявлені порушення у відсотковому співвідношенні лейкоцитів периферичної крові: збільшення кількості гранулоцитів (на  $20,7\%$ ,  $P < 0,05$ ) та підвищення їх функціональної здатності продукувати АФК ( $1424,9 \pm 212,4$  ум. од., в інтактному контролі ( $687,8 \pm 93,7$ ) ум. од.,  $P < 0,05$ ). Характер змін відповідав такому при ТВ і свідчив про гостру прозапальну реакцію гранулоцитів крові, інфільтрацію яких було виявлено у слизовій оболонці піхви гістологічним методом. Крім того у тварин із АВ ФА проявлялась зниженням

ФЧ на 27 % ( $P < 0,05$ ), що можна пояснити збільшенням у периферичній крові малодиференційованих гранулоцитів, які в меншій мірі здатні фагоцитувати бактерії, а також виснаженням цієї ланки клітинного імунітету на тлі пролонгації запального процесу у піхві щурів.

Введення МКІ-4 при даній патології приводило до збільшення інтенсивності фагоцитозу лейкоцитами (збільшення ФЧ на 19 %,  $P < 0,05$ ) і відновлення імунної ланки периферичної крові (зменшення флуоресценції DCF-DA гранулоцитами на 49,1 %,  $P < 0,05$  та збільшення флуоресценції DCF-DA агранулоцитами на 27,2 %,  $P < 0,05$ ).

Аналіз ЖК співвідношення ліпідів піхви при моделюванні АВ продемонстрував зростання відносного вмісту арахідонової кислоти в 3 рази ( $P < 0,05$ ) та зниження рівня пальмітинової кислоти у 1,1 рази ( $P < 0,05$ ), лінолевої та стеаринової – у 1,3 рази ( $P < 0,05$ ). При введенні МКІ-4 нормалізувалось співвідношення пальмітинової, стеаринової, лінолевої та арахідонової ЖК в тканині вагіни, в той час як ПП справляв зміщення останнього в сторону ННЖК в 1,2 рази ( $P < 0,05$ ).

Наступний етап був присвячений дослідженню імунологічних показників у тварин з індукованим ВЗЕ. Зміни в функціональній активності лімфоцитів та макрофагів оцінювали за допомогою МТТ-методу. Лізуюча здатність сироватки у групі ВЗЕ ( $-7,32 \pm 1,34$  %), проти ( $14,03 \pm 1,80$  % – у інтактному контролі) стимулювала проліферацію клітин-мішеней, що разом з показниками ЦІК ( $0,11 \pm 0,01$  опт. од. проти ( $0,09 \pm 0,005$ ) опт. од. – у інтактному контролі) підтверджувало наявність значного запального процесу і синтезу гуморальних факторів, що його супроводжують.

При введенні МКІ-4 за умов ВЗЕ збільшувалась ЦТАЛф ( $67,09 \pm 3,21$  % проти ( $50,5 \pm 4,18$  % в інтактному контролі,  $P < 0,05$ ), тоді як ЦТАМф не зазнавала зрушень (рис. 5).

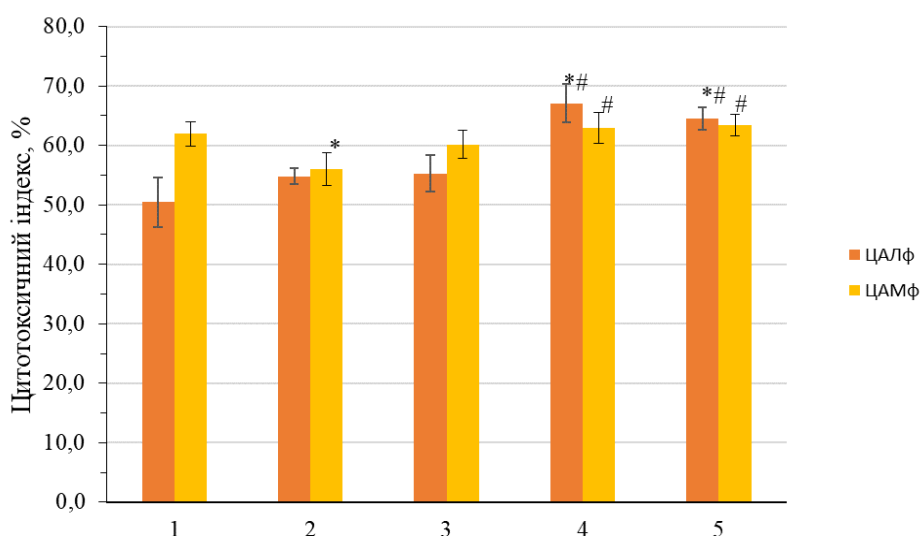


Рис. 5 – Вплив МКІ-4 на ЦТАЛф та ЦТАМф при ВЗЕ

Примітка 1. 1 – інтактний контроль; 2 – ВЗЕ; 3 – основа песаріїв; 4 – МКІ-4; 5 – ПП.  
Примітка 2. \*  $P < 0,05$  порівняно з інтактним контролем, #  $P < 0,05$  порівняно із ВЗЕ.

Крім того, проведення терапії МКІ-4 стимулювало АЗЦЛф до  $(80,7 \pm 3,02) \%$  ( $(63,09 \pm 2,92) \%$  – у контрольній патології,  $P < 0,05$ ) і знижувало рівень ЦК до  $0,09 \pm 0,005$  опт. од. (рис. 6), а лізуюча здатність сироватки наближалась до значень інтактного контролю ( $(15,68 \pm 2,13) \%$ ).

Проведення терапії песаріями МКІ-4 протягом 5 діб приводило до нормалізації даних імунологічних показників при ВЗЕ та накопичення в сироватці крові факторів, які на всіх етапах запального процесу блокували реакції, опосередковані лімфоцитами або макрофагами на фоні збереженої їх здатності до цитотоксичної активності.

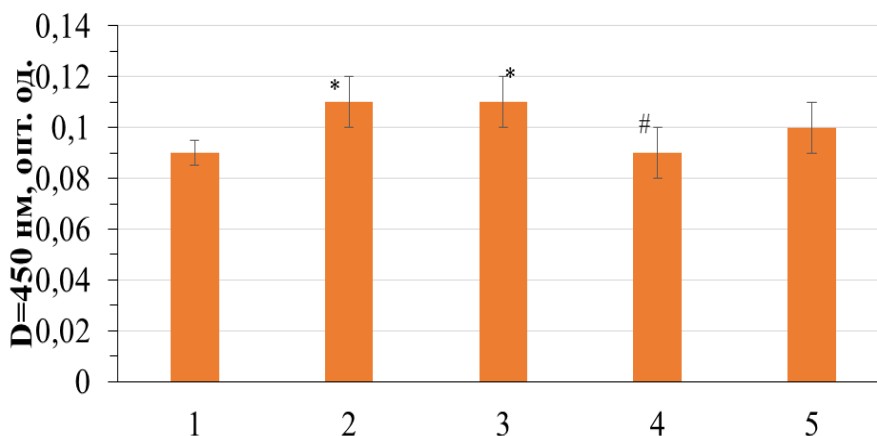


Рис. 6 – Рівень середньомолекулярних ЦК у мишей при ВЗЕ

Примітка 1. 1 – інтактний контроль; 2 – ВЗЕ; 3 – основа песаріїв; 4 – МКІ-4; 5 – ПП.

Примітка 2. \*  $P < 0,05$  порівняно з інтактним контролем, #  $P < 0,05$  порівняно із ВЗЕ.

Згідно з сучасними уявленнями основною формою існування мікроорганізмів є біоплівки – структурно організовані мікробні угруповання. Бактеріальні клітини у складі біоплівок характеризуються високим рівнем патогенності, стійкістю до захисних механізмів організму людини та резистентністю до антибіотиків та дезінфектантів (Р. Г. Кузьмич, 2017; В. В. Тец, 2012). У зв'язку з цим, наступним етапом досліджень був аналіз можливості впливу окремих компонентів та комбінації-лідера МКІ-4 на плівкоутворення аеробних бактерій (*S. aureus* 222) та дріжджоподібних грибів (*C. albicans* 1486).

В експериментах з визначення плівкоутворення за дії активних інгредієнтів песаріїв концентрації клотримазолу становили 100 мкг/мл, 200 мкг/мл, 400 мкг/мл, метронідазолу – 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл. Проведені дослідження продемонстрували, що клотримазол виявляв активність щодо біоплівок *C. albicans*; у концентраціях (100–400) мкг/мл пригнічення плівкоутворення складало  $(92,2–93,7) \%$ . Виразна активність відмічалась при дії клотримазолу на *S. aureus*, біоплівка золотистого стафілококу не формувалась. Ібупрофен також виявляв антибіоплівкову дію щодо золотистого стафілококу: так, при концентрації 20 мкг/мл його інгібувальний ефект становив 50,8 %, при 40 мкг/мл та 80 мкг/мл – 76,7 % та 72,3 %, відповідно. Інгібувальний ефект ібупрофену щодо *C. albicans* становив 70 % при концентрації 20 мкг/мл, 63,4 % та 69,2 % – 40 мкг/мл та 80 мкг/мл (рис. 7).



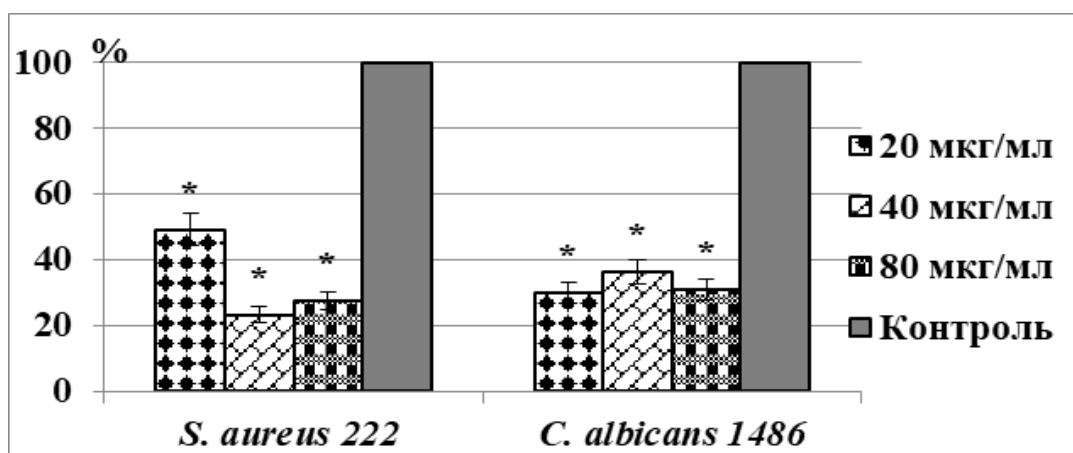


Рис. 7 – Антибіоплівкова активність ібупрофену  
Примітка. \*  $P < 0,05$  порівняно з контролем.

Результати проведених досліджень засвідчили, що інгібувальний вплив компонентів зразка МКІ-4 – клотримазолу, метронідазолу та ібупрофену на біоплівки *S. aureus* 222 складав ( $98,3 \pm 0,5$ ) %, *C. albicans* – ( $94,6 \pm 0,8$ ) %, (*S. aureus* 222 + *C. albicans* 1486) – ( $93,5 \pm 2,1$ ) %,  $P < 0,05$ . Окрім того, доведено, що основа песаріїв – вітепсол запобігала плівкоутворенню *C. albicans* 1486 (інгібування на ( $82,2 \pm 1,1$ ) %), але не впливала на формування біоплівки золотистим стафілококом. Отже, діючі речовини досліджуваних песаріїв при їх сумісному використанні проявляли виразну активність – біоплівки бактерій та грибів практично не утворювались.

Оскільки біоплівки у більшості випадків патологічних процесів є полімікробними і представлені різними видами мікроорганізмів, наступним етапом досліджень стало визначення антибіоплівкової активності песаріїв щодо мікст-культури *S. aureus* 222 + *C. albicans* 1486. Отримані дані продемонстрували, що МКІ-4 дозозалежно пригнічував плівкоутворення мікст-культурою (*S. aureus* 222 + *C. albicans* 1486), інгібування при максимальній досліджуваній концентрації клотримазолу (5000 мкг/мл, розведення 1:80) становило ( $81,7 \pm 1,8$ ) %. При зменшенні концентрації у 10 та 100 разів реєстрували зниження антибіоплівкової дії, інгібувальна активність складала ( $29,6 \pm 0,8$ ) % та ( $18,0 \pm 0,3$ ) % відповідно.

Встановлені результати доклінічних досліджень песаріїв МКІ-4 свідчать про наявність протизапального, антимікробного та антибіоплівкового ефектів, нормалізуючої дії щодо імунологічного статусу, показників ліпідного обміну в тканині піхви, а також їх безпечність. Отримані дані можуть бути основою для проведення подальших поглиблених доклінічних та клінічних досліджень з метою розробки нового оригінального препарату для інтравагінального введення.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено експериментальне обґрунтування й нове рішення наукового завдання, спрямоване на підвищення ефективності фармакотерапії запальних гінекологічних захворювань шляхом використання нових комбінованих песаріїв МКІ-4, які одночасно виявляють протимікробний та протизапальний ефекти.

1. За результатами скринінгових досліджень *in vitro* встановлено, що комбінацією-лідером в ряді зразків МК-1 – МК-15 є МК-4 (метронідазол 100 мг + клотримазол 400 мг), дія якого найбільш виражена щодо грибів (*C.albicans*) та бактерій (*S.aureus*, *C. sporogenes*). Додавання до складу песаріїв ібупрофену в дозі 80 мг (МКІ-4) не справляло негативної дії на специфічну активність клотримазолу та метронідазолу, діаметри зон затримки росту планктонних мікроорганізмів не змінювались.

2. Вивчення гострої токсичності показало, що  $LD_{50}$  комбінації-лідера МКІ-4 при в/шл введенні мишам становило понад 5000 мг/кг, на підставі чого МКІ-4 віднесено до V класу токсичності «практично нетоксичні речовини». За результатами хронічної токсичності песаріїв МКІ-4 при і/ваг разовому щоденному введенні протягом 3-х місяців в дозах 9,42 мг/кг, 94,2 мг/кг та 942 мг/кг продемонстровано відсутність їх токсичного впливу на динаміку збільшення маси тіла, коефіцієнти маси внутрішніх органів, біохімічні показники функціонального стану печінки, нирок, білкового, вуглеводного та ліпідного обмінів, а також основні показники периферичної крові. Доведено відсутність місцевоподразнювальної дії МКІ-4 при аплікації на шкіру та і/ваг введенні, про що свідчила відсутність ознак еритеми, набряку та некрозу. За результатами вивчення гострої та хронічної токсичності МКІ-4 можна вважати безпечною комбінацією при в/шл та і/ваг шляхах введення.

3. Встановлено наявність терапевтичної дії МКІ-4 при ТВ, що характеризується структурними проявами регенеративних процесів епітелію піхви. За умов введення МКІ-4 в дозі 53 мг/кг морфометрично встановлено зменшення суми балів, що характеризують ступінь порушення структури від 8 до 4 ( $P < 0,05$ ) та збільшення товщини епітелію на 97,8 %,  $P < 0,05$  порівняно з контрольною патологією. Функціональні показники лейкоцитів периферичної крові – їх перерозподіл, ФІ, ФЧ при введенні МКІ-4 свідчили про відновлення фагоцитозу гранулоцитів і зменшення інфільтрації нейтрофілів у слизову оболонку. Доведено, що застосування МКІ-4 за умов ТВ приводить до зниження вмісту арахідонової кислоти в тканині піхви в 3,2 разів ( $P < 0,05$ ) та чинить нормалізуючий вплив на рівень пальмітинової ( $(32,9 \pm 1,5) \%$ ,  $P < 0,05$ ), олеїнової ( $(21,9 \pm 1,3) \%$ ,  $P < 0,05$ ), лінолевої ЖК ( $(24,1 \pm 1,3) \%$ ,  $P < 0,05$ ), що також може бути ознакою його протизапальної терапевтичної дії.

4. Доведено наявність позитивного впливу песаріїв МКІ-4 на товщину збереженої епітеліальної пластинки та зменшення ступеня порушення структури при АВ за допомогою морфометрії. Результатами протокової цитометрії засвідчено зменшення під впливом МКІ-4 активності продуктів АФК гранулоцитами та відновлення рівня фагоцитозу. За умов АВ досліджуваний зразок МКІ-4 також знижував вміст арахідонової кислоти в тканині піхви на  $(65 \pm 3,8) \%$  ( $P < 0,05$ ), на відміну від ПП ( $(-48 \pm 3,4) \%$ ) та нормалізував рівні пальмітинової ( $(35,0 \pm 1,0) \%$ ,  $P < 0,05$ ), лінолевої ( $(26,7 \pm 1,1) \%$ ,  $P < 0,05$ ) та стеаринової ( $(13,2 \pm 0,7) \%$ ,  $P < 0,05$ ) ЖК, які задіяні в забезпеченні цілісності клітинних мембран.

5. Підтверджено, що ВЗЕ супроводжується реакціями запального типу, які призводять до порушення специфічної ланки імунної відповіді (ЦТАЛф, ЦТАМф, АЗЦЛф, АЗЦМф, ЦТА Лф+Мф, АЗЦ Лф+Мф, ЛЗС) та накопичення в сироватці

крові факторів, які на різних етапах запального процесу блокують реакції опосередковані Лф або Мф на фоні збереженої їх здатності до прояву ЦТА. Проведення терапії новою комбінацією МКІ-4 експериментального ВЗЕ приводить до відновлення імунологічної реактивності організму.

6. Встановлено, що МКІ-4 виявляв виразні інгібувальні властивості щодо біоплівки монокультур аеробних бактерій, а також бактеріально-грибкових асоціацій. У дослідженні виявлено антибіоплівкову активність ібупрофену щодо монокультур як бактерій (при концентрації 20 мкг/мл та 80 мкг/мл інгібувальний ефект становив  $(50,8 \pm 1,2) \%$  та  $(72,3 \pm 1,6) \%$  відповідно), так і грибів. Експериментально доведено наявність виразної антибіоплівкової активності компонентів зразка МКІ-4 за їх сумісної дії: щодо *S. aureus* –  $(98,3 \pm 0,5) \%$ , *C. albicans* –  $(94,6 \pm 0,8) \%$  та мікст-культури (*S. aureus* 222 + *C. albicans*) –  $(93,5 \pm 2,1) \%$ .

7. Отримані результати є підґрунтям для цілеспрямованої розробки потенційного комбінованого лікарського препарату з протизапальною та протимікробною активністю у формі песаріїв та проведення подальших поглиблених доклінічних та клінічних досліджень з метою впровадження оригінального лікарського препарату для лікування інфекційно-запальних захворювань піхви у промислове виробництво та медичну практику.

## СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Davtyan L., Nizhenkovska I., Popovich V., Maletska L., Bazas V., Zinchenko L. Studies on immunological rates and effect of vaginal suppositories on vaginitis induced animals. *International Journal of Pharmacy*. 2014. 4 (3). P. 159–161 (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті до друку).

2. Nizhenkovska I., Zinchenko L. Acute toxicity study of a new complex drug with anti-inflammatory activity. *Current Topics in Pharmacology*. 2017. Vol. 21. P. 71–74. (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті до друку).

3. Nizhenkovska I., Zinchenko L. *In vitro* susceptibility study of *Candida* spp. isolates to new combined potential medicinal product for the treatment of vaginal candidiasis. *ScienceRise*. 2018. № 1 (11). P. 47–52. (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті до друку).

4. Nizhenkovska I., Onyshchuk L., Savosko S. Efficacy study of vaginal suppositories with anti-inflammatory and antimicrobial effect on a model of experimental vaginitis. *Рецент*. 2018. № 6 (21). С. 834–843. (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті до друку).

5. Онищук Л. В. Вплив потенційного лікарського засобу з протизапальною та протимікробною активністю на жирнокислотний склад тканини піхви та сироватки крові шурів з експериментальним вагінітом. *Український науково-медичний молодіжний журнал*. 2018. № 3–4 (108). С. 71-74. (Особистий внесок – брала участь

в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті до друку).

6. Ніженковська І. В., Онищук Л. В. Дослідження впливу потенційного лікарського засобу з протизапальною та протимікробною активністю на структурні зміни слизової оболонки піхви на моделі травматичного вагініту. *Фармацевтичний часопис*. 2019. № 1 (49). С. 97–103. (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті до друку).

7. Онищук Л.В. Вплив вагінальних супозиторіїв з протизапальною та протимікробною активністю на функціональні показники лейкоцитів крові щурів за умов експериментального вагініту. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2019. № 2 (13). С. 105–113. (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті до друку).

8. Ниженковская И. В., Онищук Л. В. Чувствительность биопленок *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* к действию нового комбинированного лекарственного средства в форме вагинальных суппозиторияев. *Рецент*. 2019. № 4 (22). С. 550–558. (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті до друку).

9. Спосіб оцінки змін ліпідного метаболізму при лікуванні експериментального вагініту у щурів / Ніженковська І. В., Онищук Л. В., Брюзгіна Т. С. *Пат. на корисну модель № 144453 Україна*. МПК (2020) B01D 15/08. НМУ. – № u 2020 04447 ; заявл. 16.07.2020 ; опубл. 25.09.2020, Бюл. № 18. 4 с.

10. Спосіб оцінки змін ліпідного обміну при лікуванні травматичного вагініту у щурів / Ніженковська І. В., Онищук Л. В., Брюзгіна Т. С. *Пат. на корисну модель №144452 Україна*. МПК (2020) G01N 33/49. НМУ. № u 2020 04446 ; заявл. 16.07.2020 ; опубл. 25.09.2020, Бюл. №1 8. 4 с.

11. Ниженковская И. В., Зинченко Л. В. Исследование острой токсичности нового комплексного препарата с противовоспалительной активностью. *Молодая фармация – потенциал будущего* : материалы 4 Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием. г. Санкт-Петербург, 14–15 апреля 2014 г. Санкт-Петербург, 2014. С. 458–460.

12. Зінченко Л. В. Доклінічне вивчення подразнюючого впливу нових багатокомпонентних вагінальних супозиторій. *Новітні досягнення біотехнології та нанофармакології* : матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції. м. Київ, 22–23 жовтня 2015 р. Київ, 2015. С. 56–57.

13. Ніженковська І. В., Зінченко Л. В. Вивчення показника гострої токсичності багатокомпонентних вагінальних супозиторій. *Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я* : матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів. м. Запоріжжя, 26–27 березня 2015 р. Запоріжжя, 2015. С. 77–78.

14. Онищук Л. В. Експериментальне вивчення специфічної активності нового комбінованого лікарського засобу. *Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини* (для студентів та молодих вчених): науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 100-річчю з дня народження С. І. Корхова. м. Одеса, 19–20 квітня 2018 р. Одеса, 2018. С. 55.

15. Ніженковська І. В., Онищук Л. В. Доклінічне дослідження впливу багатокомпонентних супозиторій на імунологічні показники *in vivo*. *Ліки-людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів* : матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції. м. Харків, 28–29 березня 2018 р. Харків, 2018. С. 214.

16. Ніженковська І. В., Онищук Л. В. Дослідження антимікотичної активності *in vitro* нового потенційного лікарського засобу по відношенню до ізолятів *Candida spp.* *Актуальні питання в контексті розвитку сучасних наук* : матеріали міжнародної науково-практичної конференції. м. Дрезден (Німеччина), 23 січня 2019 р. Дрезден, 2019. С. 119–120.

17. Ніженковська І. В., Онищук Л. В. Вивчення впливу потенційного лікарського засобу з протизапальною та протимікробною активністю на ліпідний обмін на моделі експериментального вагініту. *Ліки-людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів* : матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції. м. Харків, 14–15 березня 2019 р. Харків, 2019. С. 197–198.

18. Ніженковська І. В., Онищук Л. В. Дослідження впливу нового комбінованого лікарського засобу на плівкоутворення мікст-культур. *Матеріали XXIII міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених*. м. Тернопіль, 15–17 квітня 2019 р. Тернопіль: ТНМУ, 2019. С. 355–356.

19. Nizhenkovska I. V., Onyshchuk L. V. Study of the *Staphylococcus aureus* biofilms susceptibility to the effect of a new complex drug. *Medicine under the modern conditions of integration development of European countries* : Abstracts of International Scientific Conference, Lublin, Republic of Poland, 10–11 May 2019. Lublin, 2019. P. 266–267.

## АНОТАЦІЯ

**Онищук Л. В. Експериментальне обґрунтування створення лікарського препарату для інтравагінального застосування з протизапальною та протимікробною активністю. – На правах рукопису.**

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

У дисертаційній роботі вперше на основі вивчення впливу компонентів досліджуваної комбінації на її антимікробну активність, виявлено комбінацію-лідер – МКІ-4 (метронідазол 100 мг, клотримазол 400 мг та ібупрофен 80 мг). Доведено, що комбінація-лідер відноситься до V класу токсичності «практично нетоксичні речовини» при в/шл введенні. За умови тривалого застосування МКІ-4 визначено відсутність її токсичного впливу на поведінкові реакції, масу тіла та внутрішніх органів, показники функціонального стану печінки, нирок. Доведено наявність позитивного впливу МКІ-4 на епітеліальну пластинку піхви та зменшення суми балів, що характеризують ступінь патологічного процесу при моделюванні ТВ, АВ у щурів. Встановлено вплив МКІ-4 на функціональні показники лейкоцитів периферичної крові, а саме їх перерозподіл, ФІ, ФЧ досліджуваних зразків *in vivo* на

моделях ТВ, АВ. Експериментально доведено наявність терапевтичної дії МКІ-4 при лікувальному режимі введення на фоні сформованого вагініту змішаної етіології (*S. aureus* та *C. albicans*), що підтверджувалося нормалізацією стану епітелію піхви тварин та показників імунної системи після щоденного введення МКІ-4 протягом 5 днів. Встановлено наявність, інгібувальних властивостей МКІ-4 щодо біоплівок монокультур аеробних бактерій та бактеріально-грибкових асоціацій.

*Ключові слова:* антимікробна активність, протизапальна активність, мікроорганізми, біоплівки, песарії, експериментальні вагініти.

## АННОТАЦИЯ

**Онишук Л. В. Экспериментальное обоснование создания лекарственного препарата для интравагинального применения с противовоспалительной и противомикробной активностью. – На правах рукописи.**

Диссертация на соискание научной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.03.05 «Фармакология». – Национальный фармацевтический университет МЗ Украины, Харьков, 2021.

В диссертационной работе впервые на основе изучения влияния компонентов исследуемой комбинации на ее антимикробную активность выбрано комбинацию-лидер – МКИ-4 (метронидазол 100 мг, клотримазол 400 мг и ибупрофен 80 мг). Доказано, что комбинация-лидер относится к V классу токсичности «практически нетоксичные вещества» при внутрижелудочном введении и при интравагинальном введении. При длительном применении МКИ-4 токсическое воздействие на поведенческие реакции, массу тела и внутренних органов, показатели функционального состояния печени, почек отсутствует. Доказано наличие положительного влияния МКИ-4 на эпителиальную пластинку влагалища и уменьшение суммы баллов, характеризующих степень патологического процесса при моделировании ТВ, АВ у крыс. Установлено влияние МКИ-4 на функциональные показатели лейкоцитов периферической крови, а именно их перераспределение, ФИ, ФЧ исследуемых образцов *in vivo* на моделях ТВ, АВ. Экспериментально доказано наличие терапевтического действия МКИ-4 при лечебном режиме ввода на фоне сформированного вагинита смешанной этиологии, что подтверждалось нормализацией состояния эпителия влагалища животных и показателей иммунной системы после ежедневного однократного введения МКИ-4. Установлено наличие, ингибирующих свойств МКИ-4 относительно биопленок монокультур аэробных бактерий и бактериально-грибковых ассоциаций.

*Ключевые слова:* антимикробная активность, противовоспалительная активность, микроорганизмы, биопленки, pessaries, экспериментальные вагиниты.

## SUMMARY

Onyshchuk L. V. Experimental justification for the development of drug for intravaginal use with anti-inflammatory and antimicrobial activity. – As a manuscript.

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

In the thesis, based on the study of the antimicrobial effect of the components of MC-1 – MC-15 samples, for the first time the leader-MCI- 4 (metronidazole 100 mg, clotrimazole 400 mg and ibuprofen 80 mg) combination was identified, which was studied in further experiments.

New data on the safety of the MCI-4 combination have been obtained. It is proved that it belongs to grade V toxicity "Practically non-toxic compounds" when administered intragastrally and intravaginally. When using MCI-4 in doses of 9.42 mg/kg, 94.2 mg/kg and 942 mg/kg for 3 months, no toxic effect on behavioral reactions, body weight and internal organs, indicators of the functional state of the liver and kidneys was established.

For the first time, morphometry proved a positive effect of MCI-4 at a dose of 53 mg/kg on the vaginal epithelial plate and a decrease in the sum of points that characterize the degree of the pathological process to 4 compared to TV 8 ( $P < 0.05$ ) when modeling TV, AV in rats. The positive effect of MCI-4 on the functional parameters of peripheral blood leukocytes, namely their redistribution, phagocyte index, and phagocyte number of the studied samples *in vivo* on TV and AV models, was established.

It is confirmed that vaginitis of mixed etiology is accompanied by inflammatory reactions that lead to a violation of the indicators of a specific link of the immune response (cytotoxic activity of lymphocytes, cytotoxic activity of macrophages, antibody-dependent cytotoxicity of lymphocytes, antibody-dependent cytotoxicity of macrophages, cytotoxic activity of lymphocytes+macrophages, antibody-dependent cytotoxicity of lymphocytes+macrophages, lysis ability of serum) and the accumulation of factors that at different stages of the inflammatory process block reactions mediated by lymphocytes or macrophages against the background of their preserved ability to manifest cytotoxic activity, in the blood serum. The therapeutic effect of MCI-4 pessaries in the therapeutic mode of administration in conditions of formed vaginitis of mixed etiology (*S. aureus* and *C. albicans*), which was confirmed by normalization of the state of the vaginal epithelium of animals and indicators of the immune system after a single daily administration of MCI-4 (53 mg/kg) for 5 days. Therapy with MCI-4 pessaries leads to activation of the body's immunological reactivity.

It was found that the components of MCI-4 showed distinct inhibitory properties against biofilms of monocultures of aerobic bacteria, as well as bacterial-fungal associations, suppressed film formation by mixed culture, inhibition at the maximum studied concentration of clotrimazole (5000  $\mu\text{g/ml}$ , dilution 1:80) was 81.7 %. A decrease in the concentration by 10 and 100 times was accompanied by a decrease in the antibiofilm effect (at 29.6 % and at 18.0 %, respectively,  $P < 0.05$ ). The study revealed a clear antibiofilm activity of ibuprofen against monocultures of both bacteria (at concentrations of 20  $\mu\text{g/ml}$  and 80  $\mu\text{g/ml}$ , the inhibitory effect was 50.8 % and 72.3 %, respectively) and fungi. The distinct antibiofilm effect in MCI-4 against *S. aureus* ( $98,3 \pm 0,5$  %), *C. albicans* – ( $94,6 \pm 0,8$  %), and their microbial associations (*S. aureus* 222 + *C. albicans*) – ( $93,5 \pm 2,1$  %) is shown.

*Key words:* antimicrobial activity, anti-inflammatory activity, microorganisms, biofilms, pessaries, experimental vaginitis.

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

AB	-	асептичний вагініт
АлАТ	-	аланінамінотрансфераза
АсАТ	-	аспартатамінотрансфераза
АЗЦЛф	-	антитілозалежна цитотоксичність лімфоцитів
АЗЦМф	-	антитілозалежна цитотоксичність макрофагів
АФІ	-	активний фармацевтичний інгредієнт
АФК	-	активні форми кисню
ВЗЕ	-	вагініт змішаної етіології
в/шл	-	внутрішньошлунковий
ДФУ	-	Державна Фармакопея України
ЖК	-	жирні кислоти
ІБП	-	ібупрофен
і/ваг	-	інтравагінальний
КЕ	-	клітини-ефектори
КЛ	-	клотримазол
КМ	-	клітини-мішені
ЛЗ	-	лікарський засіб
ЛЗС	-	лізуюча здатність сироватки
Лф	-	лімфоцити
МЕТ	-	метронідазол
МІК	-	мінімальна інгібуюча концентрація
МК	-	літерні шифри сполук (метронідазол, клотримазол)
МКІ	-	літерні шифри сполук (метронідазол, клотримазол, ібупрофен)
м/о	-	мікроорганізми
Мф	-	макрофаги
НЖК	-	насичені жирні кислоти
ННЖК	-	ненасичені жирні кислоти
О	-	основа песаріїв
ПП	-	препарат порівняння
ПНЖК	-	поліненасичені жирні кислоти
ТВ	-	травматичний вагініт
ФА	-	фагоцитарна активність
ФІ	-	фагоцитарний індекс
ФЧ	-	фагоцитарне число
ЦІК	-	циркулюючі імунні комплекси
ЦТА	-	цитотоксична активність
ЦТАЛф	-	цитотоксична активність лімфоцитів
ЦТАМф	-	цитотоксична активність макрофагів



Підписано до друку 21.12.2020. Формат 60x84/16. Папір офсетний.  
Гарнітура Times ET. Умов. друк. арк. 0,9. Наклад 100 прим. Замов. № 1221/6-20.

Надруковано з готових оригінал-макетів у друкарні ФОП Петров В. В.  
Єдиний державний реєстр юридичних осіб та фізичних осіб-підприємців.  
Запис № 2400000000106167 від 08.01.2009 р.  
61144, м. Харків, вул. Гв. Широнінців, 79в, к. 137,  
тел. (057) 78-17-137, e-mail:bookfabrik@mail.ua