

## **АННОТАЦИЯ**

на диссертацию Ожмухаметовой Эльвиры Келгембаевны на тему:  
«Разработка новых мукоадгезивных лекарственных форм для лечения патологий глаза» на соискание степени доктора философии (PhD)  
по специальности 6D110100 – Медицина

### **Актуальность исследования**

С развитием современной фармакологии параллельно существует создание новых систем и средств доставки лекарственных средств. Во всем мире около 285 миллионов человек страдают от нарушения зрения, причем 19 миллионов это дети, а 39 миллионов поражены слепотой (Инф. бюлл. №282, август 2014г). На сегодняшний день в мировой офтальмологии известно множество систем доставки лекарственных препаратов в ткани глаза для профилактики инфекционно-воспалительных патологий. Подавляющее большинство офтальмологов используют традиционный способ доставки лекарства – глазные капли. Однако, этот метод имеет ряд недостатков, в частности это вымывание более 90% лекарства из глаза, всасывание через слизистую в общий кровоток, что делает необходимым применение частых инстилляций (Азнабаев М.Т. 2010, Вохмяков А.В. 2007, Майчук Ю.Ф. 2003, Милованова Л.Н. 2002, Wispelway B. 2005, Washington N. 2001).

### **Цель исследования**

Разработка новых мукоадгезивных глазных лекарственных форм на основе полимеров (полиакриловой кислоты, метилцеллюлозы и Pluronic F127) и оценка их эффективности лечения на модели патологии роговицы в экспериментах *in vivo*.

### **Задачи исследования**

1. Разработать новые лекарственные формы ципрофлоксацина в виде мукоадгезивных пленок и гелеобразующих растворов с последующим изучением их переносимости в экспериментах *in vivo*;
2. Разработать малоинвазивные методики исследования удерживаемости на глазах мукоадгезивных лекарственных форм в экспериментах *in vivo*;
3. Обосновать возможность использования экспериментальной модели гнойной язвы роговицы у кроликов для оценки эффективности лечения новыми мукоадгезивными лекарственными формами в экспериментах *in vivo*;
4. Изучить и провести сравнительный анализ эффективности различных лекарственных форм при лечении экспериментальной гнойной язвы роговицы;
5. Оценить биодоступность ципрофлоксацина, заключенного в различные глазные лекарственные формы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

### **Научная новизна исследования**

Впервые для лечения патологий роговицы предложены мукоадгезивные глазные лекарственные пленки на основе комбинаций полиакриловой кислоты и метилцеллюлозы в пропорции 30/70 %, и гелеобразующие растворы для глаз на основе Pluronic F127, содержащих ЦФ.

Впервые разработаны малоинвазивные методики исследования удерживаемости полимерных лекарственных форм на глазах в экспериментах *in vivo*.

Впервые в экспериментальных условиях обоснована возможность использования модели гнойной язвы роговицы у кроликов для изучения эффективности лечения мукоадгезивными глазными лекарственными пленками на основе комбинаций полиакриловой кислоты и метилцеллюлозы в соотношении 30/70%, и гелеобразующими растворами для глаз на основе Pluronic F127, содержащих ЦФ.

Впервые проведено комплексное экспериментальное исследование эффективности лечения гнойной язвы роговицы полимерными глазными лекарственными формами с цiproфлоксацином на основе Pluronic F127 и показана возможность использования измерений ректальной температуры тела и микробиологического анализа слезной жидкости у кроликов, как показателя протекания воспалительного процесса. Мукоадгезивные лекарственные формы с цiproфлоксацином способствуют более ранней нормализации температуры тела - начиная со 2-х суток, эффективному снижению уровня КОЕ стафилококка - с 4-х суток и развитию активной регенерации в эпителии роговицы у экспериментальных животных.

Впервые хроматографическим методом рассчитана биодоступность цiproфлоксацина, введенного на поверхность глаза при помощи гелеобразующего раствора на основе полимера Pluronic F127. Гелеобразующий раствор на основе Pluronic F127 обеспечивает эффективную концентрацию ЦФ в роговице.

#### **Основные положения диссертационного исследования, выносимые на защиту**

1. Разработанные новые мукоадгезивные глазные лекарственные пленки на основе полиакриловой кислоты и метилцеллюлозы в пропорции 30/70%, и гелеобразующие растворы для глаз на основе Pluronic F127, содержащих ЦФ не вызывают побочных эффектов у экспериментальных животных.
2. Разработанная малоинвазивная методика изучения удерживаемости позволяет определить время экспозиции мукоадгезивных лекарственных форм на глазах в экспериментах *in vivo*.
3. Экспериментальная модель гнойной язвы роговицы у кроликов позволяет изучить эффективность лечения мукоадгезивными глазными лекарственными пленками на основе полиакриловой кислоты и метилцеллюлозы в пропорции 30/70 % и гелеобразующими растворами для глаз на основе Pluronic F127, содержащих ЦФ.
4. Применение гелеобразующего раствора на основе полимера Pluronic F127 и ГЛП на основе полиакриловой кислоты с метилцеллюлозой (30/70%), содержащих ЦФ характеризуется более ранней нормализацией температуры тел - начиная со 2-х суток, эффективным снижением уровня КОЕ золотистого стафилококка - с 4-х суток и развитием активной регенерации в эпителии роговицы у экспериментальных животных.

5. Применение гелеобразующего раствора на основе Pluronic F127 позволяет обеспечить в 5 раз большую концентрацию ЦФ, чем при методе инстиляции и гарантированно поддерживает эффективную концентрацию антимикробного препарата в роговице глаза.

#### **Теоретическая и практическая значимость диссертационного исследования**

Разработанные новые мукоадгезивные глазные лекарственные пленки на основе ПАК/МЦ в пропорции 30/70 % и гелеобразующие растворы для глаз на основе Pluronic F127 могут быть использованы как альтернативный подход в длительной доставке лекарств на поверхность глаза и за ее пределами при лечении травм роговицы.

Разработанная малоинвазивная методика исследования удерживаемости может быть использована для изучения различных глазных лекарственных форм в экспериментах *in vivo*.

Результаты комплексного экспериментального исследования диссертационной работы расширяют имеющиеся представления об использовании мукоадгезивных глазных лекарственных форм на основе полимеров в лечении патологии роговицы в экспериментах *in vivo*, в частности глазных лекарственных пленок на основе ПАК и МЦ в пропорции 30/70 % и гелеобразующих растворов для глаз на основе Pluronic F127, содержащих ЦФ.

Высокая концентрация ЦФ в роговице позволяет рекомендовать в фармацевтическом производстве выпуск гелеобразующих глазных капель на основе полимера Pluronic F127 и глазных лекарственных пленок на основе полиакриловой кислоты и метилцеллюлозы (30/70%).

**Дизайн исследования:** экспериментальный.

**Объект исследования:** объектом исследования данной диссертационной работы являются 147 кроликов породы «Шиншилла» весом 2500-3500 грамм, без внешних признаков заболевания. Предметом исследования явились экстрагированные роговицы глаз кроликов.

**Материалы и методы исследования:**

Для решения стоящих перед исследованием задач, работа была разделена на несколько этапов:

*Первая серия экспериментов in vivo - разработка ГЛП на основе полиакриловой кислоты и метилцеллюлозы, гелеобразующих глазных растворов на основе полимеров Pluronic F127 и F68 и изучение удерживаемости*

Разработанные новые ГЛП были изготовлены в лабораториях школы Фармации университета Рединга (Великобритания). Для изучения удерживаемости в составе ГЛП использовался рибофлавин, тогда как в качестве антибактериального препарата в лечении модельной гнойной язвы роговицы нами был использован 0,3% раствор ципрофлоксацина (действующее вещество – ципрофлоксацин 3,45 мг). Глазные капли были приготовлены путем растворения 20 об. % Pluronic F127 и Pluronic F68 в 1 мг/мл растворах флюоресцеина натрия. Растворы, содержащие Pluronic F127/Pluronic F68 и флюоресцеин натрия объемом 70 микролитров, также закапывались на поверхность роговицы.

### *Насыщение МКЛ Ципрофлоксацином*

Коммерческие мягкие контактные линзы Acuvue Oasys (Hydraclear Plus) без диоптрия пропитывали раствором ЦФ-на, соответствующим 0,3% антибактериальным глазным препаратам.

### *Спектрофотометрический метод*

Методом УФ-спектрофотометрии разработана методика оценки удерживаемости на поверхности глаза лекарственных веществ на примере модельного флуоресцеина.

### *Изучение удерживаемости*

Методом фото - и видеорегистрации изучено время экспозиции на глазах в эксперименте *in vivo* 5 видов ГЛП и 2 видов гелеобразующих растворов на основе Pluronic F127 и F68.

### *Вторая серия экспериментов – изучение переносимости ГЛП, ЛМКЛ и гелеобразующего раствора Pluronic F127*

Изучение переносимости и влияния на функциональное состояние глаза ГЛП с ЦФ проводилось на 12 кроликах по стандартной методике. Ежедневно в течение 30 дней животным опытных групп 1 раз в день на роговицу накладывали изучаемые пленки. Животным 1 группы 5 раз в день закапывали 0,9% раствор NaCl. Кроликам 2 группы накладывались пленки 30/70% на основе полиакриловой кислоты и метилцеллюлозы с ЦФ. Животным 3-ой группы закапывали гелеобразующий раствор на основе 20% Pluronic F127 также содержащие ЦФ. В 4-ой группе кроликам накладывали на поверхность глаза ЛМКЛ, пропитанные ЦФ-ном.

### *Третья серия экспериментов - моделирование гнойной экспериментальной язвы роговицы и изучение эффективности лечения различными ГЛФ*

Экспериментальная гнойная язва роговицы вызывалась путем нанесения травмы по методике адаптированной из работ Колесникова (1999). При нанесении травмы кролики находились в специальной деревянной коробке с отверстием для головы. После местной анестезии 0,04% раствором иннокаина (три инстилляций 2-х капель препарата в левый глаз кролика с интервалом 15 секунд), при помощи скальпеля в центральных отделах роговицы наносили насечку диаметром 5 мм, которая приводила к расслоению роговицы. Далее в полученный дефект втирали 1 стандартную петлю ( $10^7$ – $10^8$  КОЕ) чистой культуры золотистого стафилококка. Через сутки на всех экспериментальных глазах развивались типичные гнойные язвы роговицы.

Исследование развития инфекционного процесса при экспериментальной гнойной язве роговицы у кроликов проводилось путем ежедневного контроля температуры тела и отбора микробиологических проб на золотистый стафилококк, а также объективных показателей клинической картины.

Для бактериологического анализа на стафилококк, в ходе экспериментов в экспериментальных группах проводился ежедневный забор микробиологических проб стафилококка для дальнейшего посева в условиях лаборатории.

Для исследования морфологических изменений на глазах с гнойной язвой роговицы, глазные яблоки разрезали по экватору и отделяли непосредственно

роговицу. Потом ее фиксировали в 10% растворе формалина для доставки в лабораторию. Центральную колодку заливали в парафин. Серийные срезы окрашивали гематоксилином и эозином, исследовали на «Фотомикроскопе- III» («Оптон», Германия). Изображение регистрировали на цифровую фотовидеокамеру «Диаморф». Морфологическое исследование было выполнено на базе лаборатории «Судебно-медицинской экспертизы».

*Четвертая серия экспериментов - метод высокоэффективной жидкостной хроматографии*

Следующий этап эксперимента - это исследование биодоступности ципрофлоксацина в роговице методом высокоэффективной жидкостной хроматографии через 30 и 60 минут после применения лекарственной формы.

*Статистическая обработка данных*

Статистическая обработка результатов температурных данных, КОЕ: была использована описательная статистика, разведочный анализ, однофакторный анализ ANOVA, критерий Краскела-Уоллиса, с указанием достигнутого уровня значимости с поправкой Бонферони, робастные тесты Уэлча и Брауна-Форсайта, робастная оценка стандартного отклонения, логарифмическая трансформация данных КОЕ, для апостериорного сравнения применены критерии Геймса-Хоуэла.

Для оценки величины эффекта качественных данных использован таблиц сопряженности на уровне критериев  $\tau$ -b,  $\tau$ -c- Кендалла, потому что они являются симметричными мерами взаимосвязи между переменными. Но поскольку отек и слезотечение имели дихотомическую меру, то для них использовали анализ таблиц сопряженности с поправкой на уровне критериев  $\chi^2$  Пирсона, Йетса, Фишера.

Для анализа данных хроматографического исследования использовались также описательная статистика, разведочный анализ, ANOVA с указанием достигнутого уровня значимости с поправкой Бонферони. Для статистического описания всех результатов использовали табличное и графическое представление данных.

### **Выводы:**

1. Разработанные новые мукоадгезивные лекарственные пленки на основе ПАК/МЦ в пропорции 30-70 вес %, а также гелеобразующие растворы на основе Pluronic F127 с ципрофлоксацином обладают хорошей переносимостью и не вызывают побочных эффектов у животных в эксперименте *in vivo*. Содержание ЦФ в 1 стандартной форме ГЛП на основе ПАК/МЦ в пропорции 30-70 вес % и в 70 мкл гелеобразующего раствора на основе Pluronic F127 составляет 0,3 г, что соответствуют стандартным 0,03% каплям Ципролета.
2. Разработанная малоинвазивная методика позволяет проводить оценку удерживаемости полимерных лекарственных форм на глазах кроликов в экспериментах *in vivo*. Выявлено, что наибольшей удерживаемостью обладает гелеобразующий раствор на основе полимера Pluronic F127 – 40-50 минут и ГЛП на основе ПАК/МЦ 30-70 вес % - 50 минут.
3. Обосновано применение экспериментальной модели патологии роговицы в виде гнойной язвы у кроликов в экспериментах *in vivo* для изучения

эффективности лечения мукоадгезивными глазными лекарственными пленками на основе ПАК/МЦ в пропорции 30-70 вес % и гелеобразующими растворами на основе полимера Pluronic F127, содержащих ципрофлоксацин.

4. Проведенное комплексное экспериментальное исследование эффективности лечения гнойной язвы роговицы различными глазными лекарственными формами с ЦФ показало возможность использования измерений ректальной температуры тела и микробиологического анализа слезной жидкости у кроликов, как показателя протекания воспалительного процесса. Мукоадгезивные лекарственные формы с ципрофлоксацином способствуют более ранней нормализации температуры тела - начиная со 2-х суток ( $p=0,002$ ), эффективному снижению уровня КОЕ стафилококка - с 4-х суток ( $p=0,001$ ) и развитию активной регенерации в эпителий роговицы у экспериментальных животных. Доказано, что при лечении глазными лекарственными пленками на основе ПАК/МЦ в пропорции 30-70 вес % и гелеобразующими растворами на основе полимера Pluronic F127 эффективность превышает в 3 и более раз ( $p=0,0001$ ).

5. Методом ВЭЖХ рассчитана биодоступность ципрофлоксацина с мукоадгезивных глазных лекарственных форм в сравнении с каплями Ципролет 0,03% (Доктор Редди'с). Гелеобразующий раствор на основе Pluronic F127 обеспечивает эффективную концентрацию ЦФ в роговице в 5 раз большую, чем при использовании 0,03% капель Ципролета ( $p=0,001$ ).

#### **Публикации по теме диссертации**

По материалам диссертации опубликовано 14 работ, в том числе: в том числе - 3 статьи в журналах, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки Министерства Образования и Науки РК, 1 статья - в журнале «International Journal of Pharmaceutics», индексируемого в базе данных Thomson Reuters; 1 тезис в материалах международных зарубежных конференций, 9 тезисов в материалах международных научно-практических конференций.

Разработаны 1 рационализаторское предложение «Способ формирования патологического процесса на поверхности роговицы» 2017 год; 1 акт внедрения результатов научно-исследовательской работы «Способ формирования патологического процесса на поверхности роговицы» 2017 год.

#### **Объем и структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 5 разделов собственных исследований, обсуждения результатов, заключения и 184 списка использованных источников, включающего работы авторов 32 ближнего и 152 дальнего зарубежья. Объем диссертации 118 страниц машинописного текста. Содержит 34 таблицы и 29 рисунков.

## **АННОТАЦИЯ**

Ожмухаметова Эльвира Келгембаевнаның диссертациясына  
«Көздің патологияларын емдеуге арналған жаңа мукоадгезивті дәрілік  
қалыптардың өнделуі» тақырыбында, 6D110100 – Медицина мамандығы  
бойынша философия ғылымдарының докторы (PhD) дәрежесін алу үшін  
көрсетілген.

### **Зерттеудің маңыздылығы**

Заманауи фармакологияның дамуымен қатар дәрілік заттарды тіндерге жеткізуде және жаңа жүйе шығарылуда. Бүкіл әлемде 285 миллион адам көруінің бұзылысымен сырқаттанады, оның ішінде 19 миллионы балалар, 39 миллионы соқырлық (Ақп. бюлл. №282, тамыз 2014ж).

Бүгінгі күнге дейін әлемдік офтальмологияда инфекциялық-қабынулы патологиялардың алдын алуда көз тініне дәрілік заттарды жеткізу мақсатында жасалған көптеген жүйелер бар. Көпшілік офтальмологтар дәрілік заттың тінге толық жеткізілу мақсатында традиционды тәсілді көз тамшыларын қолданылады. Бірақ бұл тәсілдің кемшілігі - дәрілік заттың көзден 90%-дан аса шайылуына жиі әкелетіндіктен, кілегейлі қабаттан жалпы қан айналымға сіңетіндіктен жиі инстиляцияны қолдануды қажет етеді. (Азнабаев М.Т. 2010, Вохмяков А.В. 2007, Майчук Ю.Ф. 2003, Милованова Л.Н. 2002, Wispelway B. 2005, Washington N. 2001).

### **Зерттеу мақсаты**

Полимер (полиакрил қышқылы, метилцеллюлоза және Pluronic F127) негіздерінен тұратын жаңа мукоадгезивті көздің дәрілік қалыптарын өндеу және *in vivo* экспериментте нұрлы қабаттың патологиялық моделінде олардың тиімділігін бағалау.

### **Зерттеу міндеттері:**

1. Мукоадгезивті жабындылар мен гел түзетін ерітінділер түрінде жаңа дәрілік қалыптарды өндеп, ары қарай олардың көндігу қабілеттерін зерттеу;
2. *In vivo* эксперимент барысында полимерлі дәрілік қалыптардың көзде ұсталынатын аз инвазивті зерттеу әдістерін өндеу;
3. *In vivo* экспериментте қояндардың нұрлы қабат жарасының эксперименталды моделін жаңа мукоадгезивті дәрілік қалыптармен емдеу тиімділігін зерттеу үшін дәлелдеу;
4. Нұрлы қабаттың іріңді жарасын емдеуде әр түрлі дәрілік қалыптардың тиімділігін зерттеу және салыстырмалы талдау жүргізу;
5. Әртүрлі көздің дәрілік қалыптың құрамына жоғары тиімді сұйық хроматография тәсілі арқылы енгізілген антимикробты ципрофлоксацин препаратының биожетімділігін бағалау.

### **Зерттеудің ғылыми жаңалығы**

Алғаш рет көздің патологиясын емдеу үшін 30/70 % үйлесімді полиакрил қышқылы мен метилцеллюлоза негіздерінен тұратын мукоадгезивті көздің дәрілік жабындылары және де Pluronic F127 негізінен тұратын гел түзүші көздің ерітінділері ұсынылды.

Алғаш рет *in vivo* эксперимент барысында мукоадгезивті дәрілік

калыптардың көзде ұсталуын зерттейтін аз инвазивті әдіс өңделді.

Алғаш рет эксперимент барысында қояндардың нұрлы қабатының іріңді жарасының эксперименталдық моделі 30/70 % үйлесімді полиакрил қышқылы мен метилцеллюлоза негіздерінен тұратын мукоадгезивті көздің дәрілік жабындылармен және де Pluronic F127 негізінен тұратын гел түзүші көздің ерітінділермен емделуі негізделді.

Алғаш рет ЦФ құрамында бар полимерлі Pluronic F127 көздің дәрілік қалыптарымен нұрлы қабаттың іріңді қабынуының кешенді эксперименталды зерттеуі жүргізілді және қабыну ағымының көрсеткіші ретінде дене температурасының ректалді өлшеудің, қояндардың көз жасының микробиологиялық зерттеудің мүмкіншілігі көрсетілді.

Алғаш рет Pluronic F127 полимер құрамындағы ципрофлоксациннің гел түзетін сұйықтықтығының биожетімділігі хроматографиялық әдіспен бағаланды. Pluronic F127 құрамындағы гел түзетін сұйықтық нұрлы қабатта ЦФ тиімді концентрациясын қамтамасыз етеді.

### **Қорғауға ұсынылатын диссертациялық зерттеудің негізгі ережелері**

1. Өңделген 30/70 % үйлесімді полиакрил қышқылы мен метилцеллюлоза негіздерінен тұратын мукоадгезивті көздің дәрілік жабындылары және де Pluronic F127 негізінен тұратын гел түзүші көздің ерітінділері эксперименталды жануарларда жанама әсерлер тудырмайды.
2. Көзге арналған дәрілік қалыптардың ұсталуын зерттейтін аз инвазивті әдіс in vivo экспериментінде көздегі полимерлі дәрілік қалыптарды экспозиция уақытын анықтауға мүмкіндік береді.
3. Қояндардағы нұрлы қабаттың іріңді жарасының эксперименталды моделін 30/70 % үйлесімді полиакрил қышқылы мен метилцеллюлоза негіздерінен тұратын мукоадгезивті көздің дәрілік жабындылармен және де Pluronic F127 негізінен тұратын гел түзүші көздің ерітінділермен емдеу тиімділігін зерттеуге мүмкіндік береді.
4. Үйлесімді полиакрил қышқылы мен метилцеллюлоза негіздерінен тұратын мукоадгезивті көздің дәрілік жабындылардың (30/70 %) және Pluronic F127 негізінен тұратын гел түзүші көздің ерітінділердің қолдануы дене температурасының ерте қалыпқа келуімен (2-ші тәуліктен бастап), стафилококктың тиімді төмендеуімен (4-ші тәуліктен бастап) және нұрлы қабат эпителийдің белсенді регенерациясымен сипатталады.
5. Истиляция әдісіне қарағанда көздің нұрлы қабатында Pluronic F127 полимер негізіндегі гел түзетін ерітінді ЦФ концентрациясын 5 есе қамтамасыз етеді, антимикробты препараттың тиімді концентрациясын нақтылайды.

### **Диссертациялық зерттеудің теориялық және практикалық маңыздылығы**

Өңделген 30/70 % үйлесімді полиакрил қышқылы мен метилцеллюлоза негіздерінен тұратын мукоадгезивті көздің дәрілік жабындылары және де Pluronic F127 негізінен тұратын гел түзүші ерітінділері нұрлы қабат жараланғанда көз тіндіріне және одан тыс дәрілердің ұзақ жеткізудің баламалы тәсілі болып табылады.

Көзде аз инвазивті ұсталу зерттеудің әзірленген әдістемесін in vivo



эксперименттерде түрлі көз дәрілік қалыптардың зерттеу үшін пайдалануға болады.

Диссертациялық жұмыстың кешенді эксперименталды зерттеулердің нәтижелері *in vivo* экспериментте нұрлы қабаттың патологиясын емдеу барысында көздің мукоадгезивті дәрілік қалыптардың қолдануы туралы белгілі көріністерді кеңейтеді, соның ішінде үйлесімді полиакрил қышқылы мен метилцеллюлоза негіздерінен тұратын мукоадгезивті көздің дәрілік жабындылар (30/70 %) және де Pluronic F127 негізінен тұратын гел түзуші ерітінділер.

Нұрлы қабықтағы ЦФ жоғары концентрациясы фармацевтикалық өндірісте Pluronic F127 негізінде гел түзетін көз ерітінділерін және үйлесімді полиакрил қышқылы мен метилцеллюлоза негіздерінен тұратын мукоадгезивті көздің дәрілік жабындыларын (30/70 %) шығаруды ұсынуға мүмкіндік береді.

**Зерттеу дизайны:** эксперименталды

**Зерттеу объектісі:** диссертациялық жұмыстың зерттеу объектісі «Шиншилла» тұқымынан салмағы 2500-3500 грамм, ешқандай ауру белгілері жоқ 147 қояндар. Зерттеу заты қояндардың көзінің экстрагирленген нұрлы қабығы болып табылады.

**Зерттеу әдістері мен материалдары:**

Зерттеу міндеттерінің шешімінен бұрын жұмыс бірнеше кезеңге бөлінді.

*In vivo эксперименттердің алғашқы сериясы- Pluronic F127 және F68 полимерлеріне негізделген полиакрил қышқылы және метилцеллюлоза, гелді қалыптастыратын көздің ерітінділеріне негізделген көздің дәрілік қапшықтарын әзірлеу және сақтауды зерттеу*

Әзірленген жана көздің дәрілік жабындылар Ұлыбританияның Рединг университетінің Фармация мектебінде өнделген. Көздің бетінде ұсталуын зерттеу үшін көздің дәрілік жабындылардың құрамындағы рибофлавин және моделденген ірінді көз қабықшасының жарасын емдеуге арналған ципрофлоксацинның 0,3% ерітіндісі қоланған (белсенді зат - ципрофлоксацин 3,45 мг). Көзге арналған ерітінділер келесі әдіспен дайындалған: 20 об. % Pluronic F127 и Pluronic F68 1 мг/мл флюоресцеинның тұзды ерітіндісінде ерітілді. Pluronic F127/Pluronic F68 және флюоресцеин натрий ерітінділері 70 мкл көлемінде көздің бетіне тамшылатып қолданды.

*Ципрофлоксацинмен көздің жұмсақ контактты линзаларын қанықтыру*

Коммерциялық жұмсақ контактты линзалары Acuvue Oasys (Hydraclear Plus) диоптрийсыз ципрофлоксацинның ерітіндісінде қанықтырылған: 0,3% антибактериалды көз тамшыларына сәйкес.

*Спектрофотометриялық әдіс*

УФ-спектрофотометрия әдісімен жана методика өнделді: моделді флюоресцеин үлгісінде көздің бетінде дәрінің ұсталу қабілетін зерттеу.

*Ұсталу қабілетін зерттеу*

*In vivo* экспериментінде фото және видеорегистрация арқылы көздің бетінде көздің дәрілік жабындылардың 5 түрін және гелді қалыптастыратын Pluronic F127 және F68 негізінде 2 түрін экспозиция ұақытына зерттеу.

*In vivo эксперименттердің екінші сериясы- Көздің дәрілік қабықшаларының, емдеуші көздің жұмсақ контактты линзаларын, Pluronic F127 негізінен тұратын ерітінділердің көтереалмаушылықтығын зерттеу*

Көтереалмаушылықты зерттеу және көздің функционалды жағдайына әсерін көздің дәрілік қапшықтардың зерттеуі 12 қояндарда жүргізілді стандартты әдіс бойынша. Күнделікті 30 күн сайын зерттеу тобына күніне 1 рет көз қабықшаның бетіне зерттеу қапшықтар орналастырылған. 1 тобының қояндарына күніне 1 рет 0,9% NaCl ерітіндісі тамызылды. 2-ші тобының қояндарына полиакрил қышқылы және метицеллюлоза (30/70% сәйекес) негізінен тұратын қабықшалар орналастырылды. 3-ші топқа гельді қалыптастыратын 20% Pluronic F127 ерітіндісі тамызылды. 4-ші топқа қояндардың көздің бетіне жұмсақ контактты линзалары орналастырылды. Барлық көздің қалыптарының құрамында ципрофлоксацин антибиотигі бар.

*In vivo эксперименттердің үшінші сериясы –көздің нұрлы қабатының ірінді жарасын моделдеу және әр-түрлі көздің дәрілік қалыптарымен емдеу тиімділігін зерттеу*

Көзді зақымдау әдісі эксперименталды ірінді көздің нұрлы қабатының жарасы Колесников жұмыстарынан бейімделген (1999). Зақым келтірілген кезде қояндар арнайы ағаш қорапта, тек басы сыртта орналасқан. Жергілікті 0,04% иннокаин ерітіндісі тамшыланды (3 инстиляция 2-і тамшыдан қоянның сол көзіне), содан соң скальпельмен көздің нұрлы қабатының ортасында жарақат жасалды 5 мм диаметрде. Жарақатталған нұрлы қабатының арасына 1 стандартты петля Стафилококтын таза культурасы енгізілді ( $10^7$ – $10^8$  КОЕ). Бір тәуліктен соң барлық көздерде типті ірінді нұрлы қабатының жарасы дамыды.

Жұқпалы үрдістің дамуын зерттеу үшін қояндардың көздің ірінді жарасын күнделікті бақыланды: дене температурасын ректалды өлшеу, стафилококкты анықтау мақсатында микробиологиялық зерттеулер жүргізу және де күнделікті клиникалық байқаудың симптомдарын бағалау.

Бактериологиялық анализ стафилококкты анықтауға келесі әдіспен жүргізілді: күнделікті экспериментті топтарда микробиологиялық сынақпен стафилококк лабораторияда анықталды.

Көздің морфологиялық өзгерістерін зерттеу үшін негізі көздің қабаты экватормен екіге бірдей бөлініп, нұрлы қабаты бөлек аланды. Содан соң лабораторияға жеткізу үшін 10% формалин ерітіндісіне орналастырылды. Парафинге салып, кептіріп барып срездер жасалынды. Гематоксилин және эозин бояларында ұстап барып срездер жасалынды «Фотомикроскоп- III» («Оптон», Германия) аппаратында. Сүреттерді цифрлық «Диаморф» камерамен тіркелді. Морфологиялық зерттеулер «Сот-медициналық сараптамасының» лабораториясында жүргізілген.

*In vivo эксперименттердің үшінші сериясы- жоғарытиімді ерітіндіні хроматограф әдісі*

Эксперименттің келесі кезеңі – көздің дәрілік қалыптарын 30 және 60 минуттан қабылдағаннан соң, көздің нұрлы қабатында ципрофлоксацинның биотиімділігін жоғарытиімді ерітінді хроматография әдісімен зерттеу.

*Деректердің статистикалық талдау*

Дене температурасының, стафилококктың колония түзетін индексінің деректерін талдау үшін сипаттау статистикасы, іздестіру талдаулар, бірфакторлы ANOVA талдауы, Бонферрони деңгейде маңыздылықты анықтау үшін критерий Краскела-Уоллиса, Уэлч және Брауна-Форсайттың робастты тестілері, стандартты ауытқудың робастты бағалауы, КТИ деректерін логарифмалық трансформациясын, апостериорлы салыстырмаларға Геймса-Хоуэл критерийлері қолданды.

Сапалы деректерді бағалауға тау-*b*, тау-*c*- Кендалла критерийлерімен таблица сопряженности талдамасы қолданды, өйткені деректер арасында қарымқатынастықтың симметриялық өлшемі болып табылады. Ісіну мен көз жасының ағуы дихотомиялық өлшем болғандықтан  $\chi^2$  Пирсона, Йетса, Фишера критерийлері қолданды.

Хроматографиялық зерттеулердің деректерін талдау үшін сипаттау статистикасы, іздестіру талдаулар, бірфакторлы ANOVA талдауы қолданды. Барлық деректердің статистикалық сипаттамасы кестелерде және графикалық көрсетілген.

### **Қорытынды:**

1. Өнделген құрамында ЦФ бар 30-70 % үйлесімді полиакрил қышқылы мен метилцеллюлоза негіздерінен тұратын мукоадгезивті көздің дәрілік жабындылары және де Pluronic F127 негізінен тұратын гел түзүші көздің ерітінділері *in vivo* эксперименттерде жануарларда жанама әсерлер тудырмайды және төзімділік қабылеті жоғары. ЦФ концентрациясы көз жабындылардың 1 стандартында және гел түзетін ерітіндінің 70 мкл көлемінде 0,3 гр құрайды - Ципролет 0,03% көз тамшыларына сәйкес.
2. Көзге арналған дәрілік қалыптардың ұсталуын зерттейтін аз инвазивті әдіс *in vivo* экспериментінде көздегі полимерлі дәрілік қалыптардың ұсталуын бағалауға мүмкіндік береді. Үйлесімді полиакрил қышқылы мен метилцеллюлоза негіздерінен тұратын мукоадгезивті көздің дәрілік жабындылары (30/70 %) - 40-50 минут құраса, Pluronic F127 негізінен тұратын гел түзүші ерітінділері – 50 минут құрайтыны анықталды.
3. Қояндардағы нұрлы қабаттың іріңді жарасының эксперименталды моделінің үйлесімді полиакрил қышқылы мен метилцеллюлоза негіздерінен тұратын мукоадгезивті көздің дәрілік жабындыларымен (30-70 %) және де Pluronic F127 негізінен тұратын гел түзүші көздің ерітінділерімен емдеу қолдануы негізделді.
4. Ректалды дене температурасының өлшемі және микробиологиялық көз жасының талдаулардың қолдануы нұрлы қабаттың іріңді жараның көздің дәрілік түрлерімен емдеу нәтижесінде кешенді эксперименталды зерттеумен анықталды. Құрамында ЦФ бар мукоадгезивті дәрілік қалыптар эксперименталды жануарлардың дене температурасының ерте қалпына келуіне - 2-ші тәуліктен бастап ( $p=0,002$ ), тиімді стафилококктың азаюына 4-ші тәуліктен бастап ( $p=0,001$ ) және көздің нұрлы қабаттың белсенді регенерациясының дамуына ықпал етеді. Үйлесімді ПАҚ пен МЦ негіздерінен тұратын мукоадгезивті көздің дәрілік жабындыларымен және Pluronic F127 негізінен тұратын гел түзүші ерітінділерімен емдеу тиімділігі 3 есе артық екені

дәлелденді.

5. Хроматография әдісімен мукоадгезивті дәрілік қалыптардан ЦФ тиімділігі (Доктор Редди'с) 0,03% Ципролет ерітіндісімен салыстырғанда бағаланды. Гел түзетін ерітінді Pluronic F127 полимер негізінен нұрлы қабатта ғ есе жоғары ЦФ тиімді концентрациясын қамтамасыз етеді (Доктор Редди'с) 0,03% Ципролет ерітіндісімен салыстырғанда ( $p=0,001$ ).

#### **Диссертация тақырыбы бойынша жарияланымдар**

Диссертация материалдары бойынша 14 еңбектер жарияланды, оның ішінде: 3 статья, ҚР ғылым және білім беру министрлігіндегі, сапа тексеру комитетімен ұсынылған басылымдары жарияланды. «International Journal of Pharmaceutics» (Thomson Reuters) журналында 1 статья, 1 тезис халықаралық шетелдік конференцияда, халықаралық конференциялар материалдарында 9 тезистер.

18.10.2017 ж. «Көздің нұрлы қабатының бетінде патологиялық үрдістің қалыптасуының әдісі» жұмысы бойынша рационализаторлық ұсынысқа күелік алынған № 2439, «Көздің нұрлы қабатының бетінде патологиялық үрдістің қалыптасуының әдісі» енгізу акты алынды.

#### **Диссертацияның көлемі мен құрылымы**

Диссертациялық жұмыс басылып шығарылған мәтіннің 118 бетінде баяндалып, кіріспе, әдебиеттік шолу, зерттуедің 5 бөлімі, практикалық іске асыру үшін тұжырымдар мен ұсыныстардан тұратын қорытынды, пайдаланылған деректердің библиографиялық тізімі, 184 атау, 34 кесте, 29 сурет, 2 қосымшадан тұрады.

## SUMMARY

On dissertation by Ozhmukhametova Elvira Kelgembayeva  
"Development of new mucoadhesive dosage forms for treatment of eye pathologies», presented for the defense of dissertation on a competition of degree the doctor of philosophy (PhD) in the specialty 6D110100 - Medicine

### **The relevance of research:**

Worldwide, about 285 million people suffer from visual impairment, including 19 million children, and 39 million are affected by blindness [Inf. Bull. No. 282, August 2014].

Today in the world of ophthalmology, there are many drug delivery systems in the eye tissue for the prevention of infectious and inflammatory pathologies. The vast majority of ophthalmologists use the traditional method of drug delivery - eye drops. However, this method has several disadvantages, in particular, it is leaching of more than 90% of the drug from the eye, absorption through the mucous membrane into the general bloodstream, which makes it necessary to use frequent instillations (Aznabayev MT.2010, Vokhmyakov A.V. 2007, Maychuk Yu.F. 2003, Milovanova L.N. 2002, Wispelway B. 2005, Washington N.2001).

### **Purpose:**

Development of new mucoadhesive ophthalmic dosage forms based on polymers (polyacrylic acid, meticellulose and Pluronic F127) and evaluation of their effectiveness of treatment in a model of corneal pathology in experiments in vivo.

### **Research objectives:**

1. To develop a new medicinal forms of ciprofloxacin in the form of mucoadhesive films and gel-forming solutions with the subsequent study of their tolerability in experiments in vivo;
2. To develop minimally invasive methods for studying retention in the eyes of mucoadhesive dosage forms in experiments in vivo;
3. To substantiate the possibility of using an experimental model of purulent corneal ulcers in rabbits to assess the effectiveness of treatment by new mucoadhesive medicinal forms in experiments in vivo;
4. To study and conduct a comparative analysis of the effectiveness of various dosage forms in the treatment of experimental purulent corneal ulcer;
5. To assess the bioavailability of ciprofloxacin, enclosed in various ophthalmic dosage forms by high performance liquid chromatography;

### **Research design:**

Experimental.

### **Research object:**

Object of this thesis work studies are 147 mature rabbits of the Chinchilla breed weighing 2500-3300 grams, without external signs of disease. The subject of the study was the extracted corneas of rabbits' eyes.

### **Scientific novelty**

For the first time, mucoadhesive ocular medicinal films based on polyacrylic acid and methylcellulose combinations in a ratio of 30 - 70 % and gel-forming eye solutions based on Pluronic F127 containing CF are proposed for the treatment of corneal pathologies.

For the first time, minimally invasive techniques for studying the retention of polymer dosage forms on the eyes in experiments in vivo were developed.

For the first time, experimental conditions justified the possibility of using a model of purulent corneal ulcers in rabbits to study the effectiveness of treatment with mucoadhesive ocular drug films based on combinations of polyacrylic acid and methylcellulose in a ratio of 30 - 70%, and Pluronic F127 gel-forming eye solutions containing CFs.

For the first time, a comprehensive experimental study of the effectiveness of the treatment of purulent corneal ulcers with polymeric ophthalmic dosage forms with ciprofloxacin based on Pluronic F127 was conducted and the possibility of using rectal body temperature measurements and microbiological analysis of tears in rabbits was shown as an indicator of the inflammatory process. Mucoadhesive medicinal forms with ciprofloxacin contribute to an earlier normalization of body temperature, starting from the 2nd day, effectively reducing the CFU level of staphylococcus, from the 4th day and the development of active regeneration into the corneal epithelium in experimental animals.

For the first time, the bioavailability of ciprofloxacin introduced onto the surface of the eye using a gel-forming solution based on Pluronic F127 polymer was calculated by chromatographic method. Pluronic F127 gel-forming solution provides an effective concentration of CF in the cornea.

#### **The main statements for the defense**

1. Developed new mucoadhesive ocular medicinal films based on polyacrylic acid and methylcellulose in a proportion of 30-70%, and gel-forming solutions for eyes based on Pluronic F127, containing CF do not cause side effects in experimental animals.
2. The developed minimally invasive method of studying retention allows determining the exposure time of mucoadhesive dosage forms in front of an in vivo experiment.
3. An experimental model of purulent corneal ulcers in rabbits makes it possible to study the effectiveness of treatment with 30-70% mucoadhesive ocular medicinal films based on polyacrylic acid and methylcellulose and Pluronic F127 gel-forming eye solutions containing CFs.
4. The use of a polymer-based gel-forming solution of Pluronic F127 and GLP based on polyacrylic acid with methylcellulose (30-70%) containing CPF is characterized by an earlier normalization of body temperature, starting from 2 days, with an effective decrease in the CFU of *Staphylococcus aureus*, from 4 days and the development of active regeneration in the corneal epithelium in experimental animals.
5. The use of a gel-forming solution based on Pluronic F127 allows for a 5-fold higher concentration of CF than with the instillation method and is guaranteed to maintain an effective concentration of the antimicrobial drug in the cornea of the eye.

### **Practical and theoretical significance**

Developed new mucoadhesive ocular medicinal films based on PAA/MC in the ratio of 30 - 70% and gel-forming eye solutions based on Pluronic F127 can be used as an alternative approach in the long-term drug delivery to the surface of the eye and beyond its limits in the treatment of corneal injuries.

The developed minimally invasive method for studying retention can be used to study various ocular dosage forms in experiments in vivo.

The results of a comprehensive experimental study of the thesis will expand the existing understanding of the use of mucoadhesive ophthalmic dosage forms in polymers in the treatment of corneal pathology in in vivo experiments, in particular ophthalmic medicinal films based on PAA and MC in proportion 30 - 70% and gel-forming solutions for eyes based on Pluronic F127 containing CF.

The high concentration of CF-in in the cornea makes it possible to recommend the production of gel-forming eye drops based on Pluronic F127 polymer and eye films based on polyacrylic acid and methylcellulose (30 - 70%) in pharmaceutical production.

### **Materials and methods:**

To solve the tasks facing the study, the work was divided into several stages.

#### **To implement the forth task:**

Comparative analysis of the concentration of ciprofloxacin in the cornea of animals eyes with the use of Ocular Medicinal Films, eye drops, eye medicinal solutions, soft contact lenses;

The rationale for the use of gel-forming eye solutions for the prevention of infectious complications.

*The first series of in vivo experiments is the development of Ocular Medicinal Films based on polyacrylic acid and methylcellulose, gel-forming eye solutions based on Pluronic F127 and F68 polymers and the study of retention.*

Developed new Ocular Medicinal Films were manufactured in the laboratories of the School of Pharmacy at the University of Reading (United Kingdom). Riboflavin was used to study retention as part of Ocular Medicinal Film, while we used a 0.3% solution of ciprofloxacin (the active ingredient is ciprofloxacin 3.45 mg) as an antibacterial drug in the treatment of model purulent corneal ulcer. Eye drops were prepared by dissolving 20 vol. % Pluronic F127 and Pluronic F68 in 1 mg / ml fluorescein sodium solutions. Solutions containing Pluronic F127 / Pluronic F68 and 70 microliters sodium fluorescein were also buried on the surface of the cornea.

*Saturation of Soft Contact Lenses with Ciprofloxacin.*

Commercial soft contact lenses Acuvue Oasys (Hydraclear Plus) without diopter was impregnated with a solution of CF-an, corresponding to 0.3% antibacterial eye preparations.

*Spectrophotometric method*

Ultraviolet spectrophotometry method has been developed for evaluating the retention of medicinal substances on the eye surface using the example of model fluorescein.

*Learning retention*

The exposure time on the eyes in an in vivo experiment of 5 types of Ocular Medicinal Films and 2 types of gel-forming solutions based on Pluronic F127 and F68 was studied using the method of photo and video recording.

*The second series of experiments is the study of the tolerability of Ocular Medicinal Films, LSCL and the gel-forming solution Pluronic F127.*

The study of tolerability and the effect on the functional state of the *Ocular Medicinal Film* eye with CP was carried out on 12 rabbits according to the standard method. Every day, for 30 days, the test films were applied to the cornea by animals of the experimental groups once a day. Animals of group 1, 5 times a day, instilled with a 0.9% NaCl solution. Rabbits 2 groups were superimposed with 30 - 70% films based on polyacrylic acid and methylcellulose with CF. Animals of the 3rd group were instilled a gelling solution based on 20% Pluronic F127 also containing CP. In the 4th group, rabbits were placed on the surface of the eye with *LSCL*, impregnated with CP.

*The third series of experiments - modeling of a purulent experimental corneal ulcer and studying the effectiveness of treatment with various Ocular Medicinal Film.*

Experimental purulent corneal ulcer was caused by injury according to the method adapted from the work of Kolesnikov (1999). When injuring the rabbits were in a special wooden box with a hole for the head. After local anesthesia with a 0.04% solution of innokain (three instillations of 2 drops of the drug in the rabbit's left eye with an interval of 15 seconds), a notch with a diameter of 5 mm was applied with a scalpel in the central cornea, which resulted in corneal dissection. Then, in the resulting defect, rubbed 1 standard loop ( $10^7$ – $10^8$  CFU) of pure culture of *Staphylococcus aureus*. After one day, typical purulent corneal ulcers developed in all experimental eyes.

Development of an infectious process in experimental purulent corneal ulcer in rabbits by daily monitoring of body temperature and taking microbiological samples for *Staphylococcus aureus*, as well as objective indicators of the clinical picture.

For bacteriological analysis of staphylococcus, in the course of experiments in experimental groups, daily microbiological samples of staphylococcus were taken for further sowing in the laboratory.

To study the morphological changes in the eyes with a purulent corneal ulcer, eyeballs were cut at the equator and the cornea was separated. Then it was fixed in 10% formalin solution for delivery to laboratory. The central block is embedded in paraffin. Serial sections were stained with hematoxylin and eosin, examined on a "Photomicroscope - III" (Opton, Germany). The image was recorded on a digital "DiaMorph" camera. Morphological study was performed on the basis of "Forensic Medical Examination".

*The fourth series of experiments - high performance liquid chromatography method.*

The next stage of the experiment – is bioavailability study of ciprofloxacin in the cornea by High Performance Liquid Chromatography 30 and 60 minutes after applying the dosage form.

*Statistical data processing*



Statistical processing of temperature data results, CFU: descriptive statistics were used, exploratory analysis, ANOVA univariate analysis, Kruskal-Wallis criterion, indicating the level of significance achieved with Bonferoni correction, Welch and Brown-Forsythe robust tests, robust standard deviation estimate, logarithmic data transformation CFU, for a posteriori comparison, the criteria of the Game-Howela are applied.

To assess the magnitude of the effect of qualitative data, we used the analysis of contingency tables at the Tau-b, Tau-s-Kendall criteria level, because they are symmetric measures of the relationship between variables. But since the swelling and lacrimation had a dichotomous measure, an analysis of contingency tables was used for them, corrected at the level of criteria  $\chi^2$  of Pearson, Yeats, and Fisher.

Descriptive statistics, exploratory analysis, ANOVA with an indication of the level of significance achieved, with the Bonferoni correction, were also used to analyze the chromatographic data. For a statistical description of all the results used a tabular and graphical representation of the data.

### **Results:**

1. Developed new medicinal films based on combinations of PAK / MC, as well as gel-forming solutions based on Pluronic F127 with ciprofloxacin have good portability and don't cause side effects in animals in experiments in vivo. 1 standart form of eye films of PAA/MC and 70 mcg of gel-forming solutions based on Pluronic F127 consist 0,3 of ciprofloxacin, that corresponds to the standart eye drops 0,03 % of Ciprolet.
2. The developed minimally invasive method allows evaluating the retention of the study of the retention of the dosage forms in the eyes of rabbits in experiment in vivo. It was revealed that the gel-forming solution based on Pluronic F127 polymer has the highest retention - 40-50 minutes and EMF based on PAA/MC 30-70 weight % - 50 minutes.
3. Justified the use of an experimental model of purulent corneal ulcers in rabbits in experiments in vivo to study the effectiveness of treatment by mucoadhesive ocular drug films based on a PAA/MC combination of 30-70 wt% and gel-forming solutions based on Pluronic F127 polymer containing ciprofloxacin is substantiated.
4. The comprehensive experimental study of the effectiveness of treatment of purulent corneal ulcers by various ocular dosage forms with CF showed the possibility of using rectal measurements of body temperature and microbiological analysis of rabbits tears as indicator of the inflammatory process. Mucoadhesive medicinal forms with CF contribute to an earlier normalization of body temperature – starting from the 2-nd day ( $p = 0,002$ ), effective reduction of the CFU level of staphylococcus - f–om 4-th day ( $p = 0,001$ ) and the development of active regeneration in the corneal epithelium in experimental animals. It has been proven that when treating by ocular drug films based on a PAA/MC in a proportion of 30-70% by weight and gel-forming solutions based on Pluronic F127 polymer, the efficiency exceeds 3 and more times ( $p=0,0001$ ).
5. HPLC calculated the bioavailability of ciprofloxacin from mucoadhesive ophthalmic dosage forms in comparison with Ciprolet eye drops of 0,03% (Dr. Reddy's). The gel-forming solution based on Pluronic F127 provides an effective

concentration of CF in the cornea 5 times greater than when using 0,03% Ciprolet eye drops ( $p = 0,001$ ).

### **Publications on the dissertation topic**

14 works have been published on the materials of the thesis, including: including 3 articles in journals recommended by the Committee for Control of Education and Science of Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, 1 article in the "International Journal of Pharmacy" magazine indexed Thomson Reuters data; 1 thesis in the materials of international conferences abroad, 9 theses in the materials of international scientific conferences.

Developed 1 rationalization proposal "Method of forming a pathological process on the surface of the cornea"; 1 act of implementation of the results of research work "The method of forming the pathological process on the surface of the cornea" 2017.

### **The content and structure of the thesis**

Dissertation work is stated on 118 pages of computer set and consists of introduction, review of literature, materials and methods, results, conclusion, practical recommendations, the list of the used sources including 184 names (52 domestic and 132 foreign). Dissertation work is illustrated by 29 drawings and 34 tables.