

НАО Медицинский университет Семей

УДК 616-001. 28/.29: 616-003. 96-06-092-08

На правах рукописи

**ОЖМУХАМЕТОВА ЭЛЬВИРА КЕЛГЕМБАЕВНА**

**Разработка новых мукоадгезивных лекарственных форм для лечения  
патологий глаза  
(экспериментальное исследование)**

6D110100 – Медицина

Диссертация на соискание степени  
доктора философии (PhD)

Научные консультанты  
Доктор медицинских наук,  
профессор Мусин М.Н.  
Доктор медицинских наук,  
профессор Мухамбетов Д.Д.  
Зарубежный консультант  
Зарубежный консультант PhD,  
профессор Хуторянский В.В.

Семей, 2019

## СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ .....	4
ОПРЕДЕЛЕНИЯ.....	5
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ .....	6
ВВЕДЕНИЕ .....	7
<b>1 СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ГЛАЗНЫХ ЛЕКАРСТВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....</b>	<b>14</b>
1.1 Пути введения лекарств.....	15
1.2 Анализ фармакокинетики доставки глазных лекарств .....	16
1.3 Физиологические транспортеры биологических мембран глаза .....	18
1.4 Состояние современной доставки глазных лекарств в передний сегмент ...	18
1.5 Система доставки глазных лекарств через роговицу .....	26
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....</b>	<b>28</b>
2.1 Характеристика объектов исследования .....	29
2.2 Методология разработки глазных лекарственных пленок на основе полиакриловой кислоты и метилцеллюлозы с рибофлавином и ципрофлоксацином .....	31
2.3 Методология разработки гелеобразующих растворов с Pluronic F68 и F127 для глаза и изучения удерживаемости в эксперименте in vivo .....	32
2.4 Методология насыщения МКЛ ципрофлоксацином.....	33
2.5 Методология изучения переносимости (местной и общей), влияния на состояние глаз кроликов ГЛП на основе ПАК/МЦ и гелеобразующего раствора на основе Pluronic F127 .....	33
2.6 Методология моделирования экспериментальной гнойной язвы роговицы и изучение эффективности лечения различными глазными лекарственными формами, содержащими ципрофлоксацин .....	34
2.7 Методология микробиологического, морфологического и хроматографического методов исследования .....	36
2.8 Методы статистической обработки результатов исследования .....	39
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....</b>	<b>41</b>
3.1 Характеристика полученных глазных лекарственных пленок и гелеобразующих растворов .....	41
3.2 Результаты удерживаемости ГЛП, содержащих рибофлавин и гелеобразующего раствора на основе Pluronic F127 и Pluronic F68 .....	42
3.3 Результаты изучения переносимости (общей и местной) и влияние на состояние глаза лекарственных пленок, МКЛ и гелеобразующих растворов Pluronic F127, содержащих ЦФ .....	45
3.4 Результаты изучения терапевтической эффективности глазных лекарственных форм, содержащих ципрофлоксацин, на модели экспериментального воспаления глаз.....	49

3.5 Результаты хроматографического анализа распределения ципрофлоксацина в роговице.....	89
3.6 Результаты морфологического исследования роговицы глаз кроликов .....	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	98
ВЫВОДЫ.....	103
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	104
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	105
ПРИЛОЖЕНИЕ А .....	117
Удостоверение на рационализаторское предложение .....	117
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	118
Акт внедрения .....	118

## **НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ**

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 7.32-2001 – (Межгосударственный стандарт) Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления.

ГОСТ 15.101-98 – (Межгосударственный стандарт) Система разработки и постановки продукции на производство. Порядок выполнения научно-исследовательских работ.

ГОСТ 7.1-84 – Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическое описание документа. Общие требования и правила.

ГОСТ 7.9-95 (ИСО 214-76) – Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Сокращение слов на русском языке. Общие требования и правила.

ГОСТ 7.54-88 – Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Представление численных данных о свойствах веществ и материалов в научно-технических документах. Общие требования.

Закон об утверждении Правил проведения доклинических (неклинических) исследований биологически активных веществ. Утверждены приказом Министра здравоохранения Республики Казахстан от 19 ноября 2009 года № 745.

Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях.

Кодекс Республики Казахстан о здоровье народа и системе здравоохранения (с изменениями и дополнениями по состоянию на 27.02.2017г.)

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяются термины с соответствующими определениями.

**Бельмо** – беловатое васкуляризированное пятно на глазу вследствие помутнения роговой оболочки глаза.

**Малоинвазивная методика** – изучение удерживаемости глазных лекарственных форм в эксперименте *in vivo*, путем визуального наблюдения и определения концентрации флюоресцеина в слезной жидкости, без нарушения целостности оболочек глазного яблока.

**Метилцеллюлоза** – эфир целлюлозы, хорошо растворимый в холодной воде, который имеет свойство набухать, обладающий свойством мукоадгезии при соприкосновении со слизистыми оболочками биологического организма.

**Мукоадгезия** – способность объекта удерживаться на поверхности слизистых оболочек, обеспечивающая возрастание концентрации лекарственных веществ в месте аппликации.

**Поли (акриловая кислота)** – полимер акриловой кислоты, хорошо растворимый в воде, вязкость которой возрастает при увеличении степени нейтрализации. При смешении водных растворов полиакриловой кислоты с лекарствами возможно образование нерастворимых комплексов, используемых в медицине.

**Полимеры неионной природы** – высокомолекулярные соединения, обладающие высокой вязкостью при малой концентрации и растворение, которых происходит через стадию набухания.

**In situ гели** – это системы, которые применяются в виде растворов или суспензий, способные к быстрому превращению в гель, вызванному внешним стимулом, таким как температура.

**Pluronic** – неионные водорастворимые материалы, имеющие амфифильный характер, проявляющие поверхностно-активные свойства и способные взаимодействовать с гидрофобными поверхностями, и биологическими мембранами.

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

БМЛУ	– Белки с множественной лекарственной устойчивостью
ВПК	– Влага передней камеры
ВЭЖХ	– Высокоэффективная жидкостная хроматография
ГЛП	– Глазная лекарственная пленка
ГПМЦ	– Гидроксипропил метилцеллюлоза
КОЕ	– Колонииобразующие единицы
МГЛФ	– Мукоадгезивные глазные лекарственные формы
МКЛ	– Мягкая контактная линза
МПА	– Мясопептонный агар
МЦ	– Метилцеллюлоза
ПАК	– Полиакриловая кислота
ПАМАМ	– Полиамидоамин
ПКГ	– Передняя камера глаза
ПФ	– Подвижная фаза
ПЭГА	– Полиэтиленгликольдиакрилат
ПЭГ	– Полиэтиленгликоль
Р-ГП	– Р-гликопротеин
РК	– Республика Казахстан
ЦФ	– Ципрофлоксацин
ANOVA	– Analysis of Variance (Дисперсионный анализ)
М	– Mean (среднее арифметическое)
Me	– Mediana (медиана)

## ВВЕДЕНИЕ

Настоящая работа представляет собой экспериментальное исследование *in vivo* на кроликах, включающая разработку новых мукоадгезивных глазных лекарственных пленок на основе ПАК/МЦ и гелеобразующего раствора на основе полимера Pluronic F127, разработку малоинвазивной методики исследования удерживаемости новых мукоадгезивных глазных лекарственных форм, научное обоснование использования модели патологии роговицы в виде гнойной язвы для изучения эффективности лечения новыми мукоадгезивными ГЛФ, комплексное изучение эффективности лечения экспериментальной гнойной язвы роговицы различными ГЛФ на основе бактериологического, хроматографического и патоморфологического исследования экстрагированных тканей роговицы.

### Актуальность

За последние годы с развитием современной фармакологии параллельно существует создание новых систем и средств доставки лекарственных средств (ЛС). Последнее имеет важное прикладное значение для решения основных проблем клинической практики. Фармакологический поиск и синтез новых субстанций для ЛС приведет к повышению терапевтической эффективности, переносимости и безопасности лекарственной терапии.

В структуре общей заболеваемости населения РК офтальмопатология занимает пятое место после заболеваний дыхательной, сердечнососудистой, пищеварительной и мочеполовой систем [1]. Во всем мире около 285 миллионов человек страдают от нарушения зрения, причем 19 миллионов это дети, а 39 миллионов поражены слепотой [2]. Между тем, согласно данным Всемирной организации здравоохранения (2016), около 80% слепоты в мире поддаются лечению и профилактике. Среди них, прежде всего, это катаракта (47% слепоты в мире), глаукома (12%), возрастная макулодистрофия (9%), диабетическая ретинопатия и роговичная слепота (по 5%). По данным последних лет, болезни глаз встречаются довольно часто, при этом, на долю заболеваний роговицы приходится 25%, причем, иногда это ведет к снижению или полной потере зрения [3,4]. В Казахстане по официальным данным, ежегодно к офтальмологам обращается 1 миллион человек [1, С. -24]. Среди основных причин – травмы, воспалительные заболевания, близорукость, катаракта, глаукома и возрастная макулодистрофия. Каждый год в республике число лиц, впервые ставшими инвалидами по зрению составляет 2000 человек. Всего же, учтенное количество случаев слепоты и слабовидения - 56 тысяч, из них детей – 1800. Проблема травматизма является одной из актуальных и социально значимых в современной офтальмологии. Одной из основных причин монокулярной слепоты во всем мире является травмы органа зрения [5,6]. В контингенте инвалидов основная доля приходится на лица трудоспособного возраста.

Роговица, будучи менее защищенной от воздействия внешних факторов, чем другие части глаза, часто подвергается травмам [7]. Несмотря на широкие

мероприятия по предупреждению глазного травматизма, в том числе и тяжелого, риск развития слепоты не уменьшается. Чаще всего травмы роговицы вызываются попаданием в глаз инородных тел или воздействием физических и химических факторов (ожоги термической, химической и лучевой природы). А также причинами снижения остроты зрения и слепоты являются язвы роговицы, что в развитых странах составляет от 6,3 до 23,2% [8]. Среди травматических повреждений роговицы чаще всего встречаются: эрозии и инородные тела, развивающиеся вслед за ним кератиты, непроникающие и проникающие ранения и ожоги различной этиологии.

На сегодняшний день мировой офтальмофармакологии известно множество систем доставки лекарственных препаратов в ткани глаза для профилактики и лечения инфекционно-воспалительных патологий. Подавляющее большинство офтальмологов используют традиционный способ доставки лекарства – глазные капли. Однако этот метод имеет ряд недостатков, в частности это вымывание слезой более 90% лекарства из глаза, всасывание через слизистую в общий кровоток, что делает необходимым применение частых инстилляций [9,10,11,12,13,14].

После проведенного многочисленного анализа литературы можно констатировать, что для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний роговицы, например, кератита используют терапию на основе антимикробных препаратов, таких как фторхинолоны (офлоксацин, цiproфлоксацин, норфлоксацин), антибиотики (левомицетин, тобрамицин), а также противовоспалительные препараты (дексаметазон, преднизолон) [15]. В ранних работах по оценке токсичности было установлено, что цiproфлоксацин обладал наименьшей токсичностью по отношению к роговичному эпителию в сравнении с норфлоскацином и офлоксацином, а также тобрамицином и гентамицином [16].

Однако необходимая концентрация антимикробных препаратов для подавления роста микроорганизмов не достигается при инстилляциях и носит только кратковременный характер, в то время как терапевтическая концентрация тех же антибиотиков требует постоянного поступления в переднюю камеру глаза. По мнению многих исследователей, при инстилляции антибиотиков не обеспечивается эффективная профилактика посттравматических инфекционных осложнений [17,18,19,20,21].

В современных условиях здравоохранения в офтальмотерапии большое значение придается как поиску новых эффективных методов лечения, так и разработке новых лекарственных форм для оказания квалифицированной медицинской помощи пациентам с травмами глаза [22,23]. Внедрение новых медицинских технологий в офтальмологическую практику является острой необходимостью, поскольку утрата зрения населения вызывает в медицинском и социальном отношении тяжелые последствия.

Можно выделить главные, традиционно используемые лекарственные формы, такие как растворы, суспензии, эмульсии и мази, которые способны лечить только ограниченное количество глазных болезней. Согласно данным



литературы имеет место использование новых форм, таких как импланты, предварительно сформированные гели, *in situ* гели, микрочастицы, липосомы, ниосомы, наногели, наночастицы и микроиглы, являющиеся передовыми системами, обеспечивающими более эффективную доставку глазных лекарств [24,25].

Офтальмофармакология не стоит на месте, и поэтому использование водорастворимых полимеров является одним из перспективных подходов для улучшения биодоступности глазных лекарств [26,27]. Эти материалы обладают рядом уникальных физико-химических свойств, способствующих лучшему удержанию в области конъюнктивы и на поверхности глаза. Благодаря достаточно высокой молекулярной массе, а также цепному строению макромолекул, полимеры, как правило, медленно растворяются в слезной жидкости, и сам процесс их растворения обычно проходит через стадию набухания. Процесс смывания с поверхности глаза замедляется, так как растворы полимеров обладают повышенной вязкостью.

Как выяснилось, за последние десятилетия количество заболеваний роговицы неуклонно растёт за счет снижения иммунитета, нерационального использования антибиотиков, несоблюдения гигиены и режима ношения контактных линз, более интенсивным применением хирургических методов лечения глазных патологий и большими нагрузками, которые испытывает орган зрения человека [28].

Каждый слой глазной ткани может выступать в качестве барьера, основанных на физико-химических свойствах лекарственного средства, свойствах носителя лекарственного препарата и механизмах очищения для данного пути введения. Таким образом, системы доставки и подходы должны быть оптимизированы для конкретной целевой ткани. Для целевой доставки лекарств, глаз можно разделить на 2 основных сегмента: передний сегмент - от передней части глаза до хрусталика и задний сегмент, включающий ткани глаза за хрусталиком. Эти две различные области глаза уникальны и сталкиваются с разными проблемами доставки лекарств, и поэтому должны рассматриваться отдельно. Современные исследования являются перспективными с точки зрения преодоления проблем при лечении различных заболеваний переднего и заднего сегментов.

Традиционно медико-биологические эксперименты, в том числе исследования глазных лекарств, проводятся на млекопитающих. В этом смысле подходящим объектом исследования в нашей работе явились кролики породы Шиншилла, которые отличаются от других млекопитающих своим спокойствием [29,30].

Улучшение удерживаемости лекарственного средства на роговице и увеличение её проницаемости являются двумя основными подходами для оптимизации местной доставки в глаза, которые побудили нас исследовать в экспериментах на кроликах новые мукоадгезивные лекарственные формы для лечения патологий глаза.

### **Объект исследования**

В общей сложности для данного экспериментального исследования были использованы 147 кроликов.

### **Предмет исследования**

Оценили биодоступность ципрофлоксацина с 5 различных глазных лекарственных форм в роговице глаза у 30 половозрелых кроликов методом ВЭЖХ.

### **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 соотношении 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 патологии роговицы в виде гнойной язвы 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 ципрофлоксацином 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 ципрофлоксацином 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 ципрофлоксацина, 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 инстилляций 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%).

#### **Апробация работы**

Диссертация апробирована на заседании №9 кафедры фармакологии имени д.м.н., профессора Мусина М.Н. НАО МУС, на заседании №1 Межкафедрального совещания по специальности 6D110100 - Медицина НАО МУС 19 февраля 2019 года.

Основные положения и результаты исследования были обсуждены и доложены на XI, XII и XIII Республиканских научно-практических конференциях «Экология. Радиация. Здоровье» Семей, Казахстан (2015,2016,2017); Международной Конференции в КазНУ имени Аль-Фараби «Полимеры и гидрогели для лечения ран и других биомедицинских целей» Алматы, Казахстан (2017); Научном семинаре для молодых ученых в университете Шакарима «Научные достижения в области медицины, радиоэкологии, пищевой и химической технологии для радиационной безопасности» Семей, Казахстан (2017).

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

По материалам диссертации опубликовано 14 работ, 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 тезисы доклада в материалах международной зарубежной конференции, 9 тезисов в материалах международных научно-практических конференций.

Разработано 1 рационализаторское предложение «Способ формирования патологического процесса на поверхности роговицы» (Приложение А); 1 акт внедрения результатов научно-исследовательской работы «Способ формирования патологического процесса на поверхности роговицы» 2017 год (Приложение В).

#### **Личный вклад автора**

Все основные разделы представленной работы (сбор материалов, обработка данных, анализ материалов исследования, интерпретация результатов) выполнены при непосредственном участии автора на всех этапах исследования.

### **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.

## **1 СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ГЛАЗНЫХ ЛЕКАРСТВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)**

Множество глазных заболеваний поражают миллионы людей во всем мире, и большинство из них оказывает негативное влияние на зрение в целом, и приводит к снижению качества жизни пациентов. Основные глазные заболевания включают в себя возрастную макулодистрофию (ВМД), диабетическую ретинопатию (ДР), катаракту, увеит и глаукому, что может повлечь за собой слепоту, если их не лечить [31].

Человеческий глаз представляет собой около 7,5 грамм глобулярной структуры диаметром около 24 мм, состоящей из различных тканей, каждая из которых имеет различные особенности и играет важную роль в зрении [32]. Поскольку глаза являются продолжением центральной нервной системы (ЦНС), он хорошо защищён от токсичных веществ при помощи многочисленных барьеров, которые по своей сути ограничивают доставку лекарств. Барьеры для доставки глазных лекарств являются специфичными в зависимости от целевой ткани и путей введения [33,34].

Результаты фармакологических исследований, как в России, так и за рубежом однозначно свидетельствуют о том, что одной из основных проблем офтальмофармакологии последних десятилетий в доставке глазных лекарств через традиционные лекарственные формы является раздражение глаза, которое приводит к дискомфорту пациента, а также уменьшению биологической доступности препарата благодаря слезоточивости. Большинство глазных лекарств имеют нейтральную основу, и для повышения их растворимости, их изготавливают в растворах с низким pH, что может привести к плохой диффузии в глазах, вызванной ионизированным состоянием молекулы лекарства. Многочисленные исследования показывают, что ещё одной проблемой, которая возникает в доставке лекарственного средства в глаза, является многократное применение для поддержания терапевтической дозы в ткани-мишени из-за короткого времени пребывания в прекорнеальной зоне. Лекарство, применяемое в виде глазных капель, быстро дренируется через нослезный канал и поступает в системный кровоток, что приводит к нежелательным побочным эффектам.

Многочисленные анализы позволили определить, что при разработке системы доставки глазных лекарств необходимо учитывать несколько факторов, которые должны преодолеть существующие препятствия. К ним относятся повышенная точность дозы, повышенная биодоступность вводимых препаратов за счёт преодоления статических и динамических барьеров, а также постоянная и целенаправленная доставка глазных лекарств для повышения эффективности лечения и удобства для пациентов [35,36]. Поэтому, с фармакологической точки зрения данная работа посвящена изучению биодоступности лекарственных веществ в роговице с различных глазных лекарственных форм с учетом вышеизложенных факторов.

## 1.1 Пути введения лекарств

Существующие барьеры в доставке глазных лекарств являются специфичными для путей введения. Можно выделить несколько основных путей введения препаратов в глаза: местные, периокулярные, интраокулярные и системные.

Согласно литературным данным, местное введение является наиболее распространенным способом лечения заболеваний переднего сегмента глаз благодаря простоте применения, локализации препарата, адекватной эффективности и низкой стоимости. Тем не менее, при использовании пипетки из-за ограниченной удерживающей способности в прекорнеальной зоне, доставляется около 30-50 мкл глазного раствора. Глазные капли смешиваются со слезами и вытекают носослезным каналом, пока не достигнут приблизительно 7 мкл, что соответствует объему слезной жидкости в норме. В результате непрерывного образования слезной жидкости, лекарство быстро смывается с поверхности глаза, а оставшийся препарат сталкивается с барьерами, что приводит к доставке менее 5 % от введенной дозы в передний сегмент для большинства лечебных средств. Препарат, вводимый в внутриглазные ткани, также быстро вымывается через водянистую влагу и кровообращение [37, 41.С-2015-2108,38,39]. Поэтому для поддержания адекватной концентрации препарата в глазу, требуется частая инстилляционная лекарственными средствами. В дополнение к низкой проницаемости роговицы после местной инстилляции, короткое время пребывания в прекорнеальной зоне является критическим фактором, ограничивающим скорость преодоления барьера роговицы глаза [40,41,42]. Из-за малоэффективной доставки лекарств, местное применение, как правило, предназначено лишь для лечения заболеваний поверхности глаз и переднего отрезка, однако в литературе также имеются сведения, указывающие на возможную доставку лекарств и в задний отрезок [43].

Доказано, что пероральные и парентеральные способы введения являются наиболее распространенными методами доставки. Но при этом пероральный путь является наиболее удобным. Несмотря на то, что системное введение может быть полезным в лечении глазных патологий, это требует более высоких доз и частого применения, так как существуют недостатки, включающие разведение препарата в крови, кровеносные барьеры, ограничение проницаемости лекарств. Кроме того, препараты, вводимые по системному пути, подвергаются метаболизму в печени и экскреции почками, в результате, которого обычно только небольшое количество достигает стекловидного тела [44,45]. Однако, высокие дозы лекарств и частое применение обычно приводят к системным побочным эффектам.

В литературе имеются сообщения, что подконъюнктивальное введение обычно используется как периокулярный способ доставки препарата во внесклеральное пространство. Так по данным разных авторов, другие периокулярные способы введения включают задний юкстасклеральный, перибульбарный и ретробульбарный пути. Склера имеет большую площадь

поверхности ( $\sim 16,3 \text{ см}^2$ ) [46], а субконъюнктивальное пространство может расширяться и служить местом-депо лекарственных веществ для доставки в передний и задний отделы глаза [47,48].

Многие исследователи считают, что по сравнению с неинвазивными способами введения, включая местный и пероральный пути, внутриглазное введение путем инъекции или имплантации является более сложным и неудобным для пациентов; однако в большинстве случаев это единственный вариант лечения заболеваний заднего сегмента. Интравитреальная инъекция является одним из типов интраокулярных манипуляций, которая получила широкое признание в последние годы в связи с коммерческим успехом некоторых применяемых в медицине инновационных средств. Другие внутриглазные методы введения включают субретинальные и супрахориоидальные пути применения.

Таким образом, данные, накопленные в результате множества исследований, показывают, что интравитреальные, периокулярные, субретинальные и супрахориоидальные методы введения лекарственных веществ являются ключевыми транспортными путями, которые были изучены для преодоления проблемы, связанные с доставкой препаратов, где местное и системное применение было неадекватным.

## **1.2 Анализ фармакокинетики доставки глазных лекарств**

Из литературных данных известно, что фармакокинетика глазных лекарств является усложненной и, как правило, её сложнее описать по сравнению, с системной фармакокинетикой. Частично это объясняется уникальной структурой глаза, различными путями введения и видами лекарственных средств. Насколько трудно собрать данные о фармакокинетике глазных лекарств, настолько затруднено моделирование этих форм, потому что литература ограничена, а имеющаяся, как правило, охватывает лишь измерение уровней лекарственных веществ в жидкой среде глаза [49,50,51,52]. Трудно разработать прогноз для количественной коррекции различных видов глазных лекарств, поскольку большинство из этих исследований были проведены на кроликах с разными анатомическими и физиологическими особенностями (такими как частота моргания, объём слезы, поверхность роговицы) по сравнению с человеческими глазами [29,С.- 196-199]. В последние десятилетия современное представление ученых о системах доставки распространяется на узкий спектр глазных лекарственных средств, представленный в таблице 1. Но в настоящее время разрабатываются прогностические модели для оценки витреального периода полувыведения новых химических объектов [53].



Таблица 1 - Преимущества и недостатки ключевых путей доставки глазных лекарств [модифицирована из Gaudana et al. 2010]

Пути введения	Преимущества	Недостатки
Местно	<ul style="list-style-type: none"> <li>-неинвазивно</li> <li>-саморегулирование</li> <li>-удобство для пациента</li> <li>-возможно длительное применение в течение дня</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-низкая биодоступность</li> <li>-носолезный дренаж</li> <li>-эпителиальные барьеры</li> <li>-неэффективен для доставки в задний сегмент</li> </ul>
Системное	<ul style="list-style-type: none"> <li>-возможна доставка в оба сегмента</li> <li>-возможное место для депо</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-низкая биодоступность</li> <li>-гематофтальмический барьер</li> <li>-пигментный эпителий сетчатки</li> <li>-системная токсичность и побочные эффекты</li> </ul>
Периокулярно/ супрахориоидально	<ul style="list-style-type: none"> <li>-обычно для ретинальной доставки гена</li> <li>-в обход пигментного эпителия сетчатки</li> <li>- длительная ретинальная доставка гена</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-инвазивность</li> <li>-неудобство для пациента</li> <li>-очищение через циркуляцию</li> <li>-пигментный эпителий сетчатки</li> <li>-потенциальные геморрагии</li> </ul>
Субретинально	<ul style="list-style-type: none"> <li>-эффективность ретинальной доставки</li> <li>-длительная доставка до 3 лет</li> <li>- обход нескольких барьеров в глазах</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-инвазивность</li> <li>-неудобство для пациента</li> <li>-отслойка сетчатки и риск повреждения сетчатки</li> </ul>
Интравитреально		<ul style="list-style-type: none"> <li>-инвазивность</li> <li>-100% биодоступность в стекловидное тело</li> <li>- неудобство для пациента</li> </ul>

Физико-химические свойства лекарственных препаратов, такие как молекулярная масса, растворимость, липофильность и уровень ионизации играют важную роль во всасывании глазных лекарств. Несмотря на то, что конъюктива обладает большей проницаемостью, роговица остаётся наиболее важным барьером с многослойной структурой для всасывания препаратов в переднем отрезке. Процесс выведения различных лекарств из глаз может сильно варьироваться. Отсюда следует вывод о том, что дренаж через носослезный канал, оборот жидкой среды, и выход в системную циркуляцию из глазных тканей являются одними из важных путей элиминации. Эти аспекты и фармакокинетика глазных лекарств будут обсуждены в других главах и послужат основанием в исследовании изучаемых в данной работе глазных лекарственных форм.

### **1.3 Физиологические транспортеры биологических мембран глаза**

В роговице, конъюктиве, сетчатке и кроветворных барьерах присутствуют несколько белков - переносчиков биологических мембран, включая белки притока и оттока, которые могут влиять на биодоступность лекарственного средства [54,55]. Предназначенные для них модификации, могут быть альтернативным подходом для улучшения биодоступности глазных лекарств.

Ученые отмечают, что транспортные белки притока имеют тенденцию к снижению клеточной биодоступности путем транспортировки лекарств из клетки. Р-гликопротеин (Р-ГП) и белок с множественной лекарственной устойчивостью (БМЛУ) являются ключевыми транспортными белками, имеющими связь с глазными тканями [56,57,58]. Р-ГП выводят липофильные лекарства и предотвращают их накопление в клетках. Р-ГП присутствуют в роговице, конъюктиве, цилиарном не пигментированном эпителии, радужной оболочке и сетчатке [59,60]. БМЛУ работает так же как Р-ГП для выходящих органических анионов и их конъюгатов [61,62].

С другой стороны, транспортные белки притока, которые принадлежат к семейству растворяющего носителя, транспортируют необходимые питательные вещества и ксенобиотики через биологические мембраны [63,64]. Транспортные белки притока включают аминокислоты, пептиды, витамины, сахар, лактат и нуклеозидные носители. Разработка пролекарств, нацеленных на эти белки, являются важным подходом в доставке глазных лекарств, а два основных транспортера - это переносчики аминокислот и белков. Некоторые белки - переносчики аминокислот, идентифицированные в глазах, включают в себя аланин-серин-цистеин 1, аланин-серин-цистеин 2, крупные нейтральные аминокислоты 1 типа, крупные нейтральные аминокислоты 2 типа [63,64,65,66,67]. Пептидные переносчики также были исследованы, и были обнаружены в эпителии роговицы [68,69]. Наряду с этими переносчиками в различных тканях глаза были идентифицированы переносчики витаминов, нуклеозиды, монокарбоксилаты, органические катионы и анионы [70,71].

Из вышеизложенного следует, что как передний, так, и задний сегменты глаза имеют различные транспортные пути доставки, которые являются перспективными для разработки пролекарств в системе глаза человека.

### **1.4 Состояние современной доставки глазных лекарств в передний сегмент**

Для лечения заболеваний переднего сегмента, таких как синдром сухого глаза, конъюктивит, глаукома, послеоперационное воспаление и увеит, были изучены различные подходы для улучшения доставки через глазные ткани и повышения терапевтической эффективности. Среди традиционных лекарственных форм используются растворы, суспензии, эмульсии и мази. Вязкие гели, мукоадгезивные средства, пролекарства и наносистемы являются новыми подходами, используемыми для увеличения или поддержания доставки и эффективности лекарств, снижения системных побочных эффектов и

улучшения удобства и соответствия пациентам. Ниже рассмотрим некоторые ключевые лекарственные формы, используемые в терапии глазных болезней.

### **Мукоадгезивные средства**

Увеличение времени удержания лекарств на роговице является одним из важных аспектов в повышении биодоступности препаратов в тканях глаза. Мукоадгезия - это прикрепление к любой слизистой оболочке, с помощью физических, либо химических связей, которое может увеличивать время пребывания лекарственной формы на поверхности, способствуя наилучшему всасыванию лекарства [72]. В настоящее время наиболее распространенными мукоадгезивами, используемые в окулярных препаратах, являются водорастворимые полимеры, такие как производные полиакриловой кислоты, включая карбомеры, ксантановую смолу, каррагинан, хитозан и гиалуроновую кислоту, которые не могут пройти окулярные барьеры. Биодгезивные микросферы также изготавливают для прилипания к окулярному муциновому слою и продления времени пребывания на роговице любых ассоциированных терапевтических агентов [73,74,75]. Группа ученых под руководством Хорват Г. протестировала новое производное гиалуроновой кислоты для раскрытия мукоадгезивных свойств в системе доставки глазных лекарств [76]. Как показали исследования, сшитые натриевые, линейные натриевые и цинк-гиалуроновые составы наночастиц были охарактеризованы, как потенциальные системы для доставки лекарств. Другой подход заключается в объединении нанотехнологий с мукоадгезивными системами. В качестве вышеизложенного примера этого подхода, Chaiysan и его сотрудники разработали и охарактеризовали мукоадгезивные наночастицы хитозан-декстрансульфата для непрерывной доставки. Основываясь на исследованиях мукоадгезии *in vitro*, авторами показана перспективность применения данной системы [77,78].

### **Гели: *in situ* гели**

В настоящее время основное внимание в исследованиях уделяется гелям *in situ* в виде растворов, которые начинают гелеобразование при контакте с поверхностью глаз, в зависимости от pH и температуры. Эти системы имеют такое преимущество, что их можно легко внедрить в виде обычных глазных капель и тем самым обеспечить длительное время удержания и продолжительное высвобождение лекарства с уникальными свойствами гелеобразования. Все это приводит к повышению биодоступности лекарственных веществ [79,86. С.-384]. Гелеобразование на слизистой оболочке глаз может быть вызвано изменением pH, температуры и содержанием ионов. Ученые изучили слабосшитые производные поли (акриловой кислоты), с pH-чувствительными свойствами *in situ*, такие как Carbopol<sup>®</sup>, которые уже используются в качестве фармацевтических наполнителей [80]. Однако из-за анионной природы полимера Carbopol<sup>®</sup>, они вероятно будут иметь ограниченное применение для катионных лекарственных средств, которые могут образовывать нерастворимые комплексы, приводящие к разделению фаз [81,82]. В ходе исследований было выявлено, что приготовленный в геле

пилокарпин, оказался более эффективным, чем обычный в виде водного раствора [83,84,85]. Sachinkumar и его коллеги, используя гидропропил метилцеллюлозу (ГПМЦ) в смесях с Carborol<sup>R</sup>, приготовили pH-чувствительный *in situ*-гелевый препарат-норфлоксацина, для лечения глазных инфекций. Система была протестирована *in vitro* и все еще требует исследований *in vivo* для подтверждения свойств гелеобразования *in situ* [86].

До конца не изученные триблок-сополимеры полиэтиленгликоль-b-полипропиленгликоль-b-полиэтиленгликоля, коммерчески доступные как Pluronic, вызывают особый интерес в качестве фармацевтических наполнителей. Это неионные водорастворимые материалы, имеющие амфифильный характер, проявляющие поверхностно-активные свойства и способные взаимодействовать с гидрофобными поверхностями, и биологическими мембранами [87,88]. Как показывает анализ литературы, в водных растворах Pluronic может самостоятельно собираться с образованием мицелл, которые также нашли применение в солюбилизации плохо растворимых лекарств [89,90,91]. Также известно, что Pluronic образует гели в ответ на повышение температуры [92,93,94]. Поскольку гели образуемые полимерами Pluronic являются прозрачными, то они не мешают нормальному зрению и поэтому наиболее подходят для применения в офтальмологии. Сообщалось о нескольких глазных препаратах, которые содержали комбинации Pluronic F127 и альгината [95], хитозана [96] и простых эфиров целлюлозы [97].

Гидрогели имеют множество применений в лечении глазных болезней, в том числе в гелеобразующих композициях, мягких контактных линзах, глазных адгезиях для восстановления после травмы [30, С. -51]. Высокое содержание воды в гидрогелях может быть выгодным для сохранения стабильности пептида-белка. Химически сшитые термочувствительные гидрогели, которые имеют высокое содержание воды и сохраняют прозрачность, использовались в качестве гелей, образующих *in situ* [98].

Дендримерная гидрогелевая система была разработана с использованием полиамидоамина (ПАМАМ) для доставки антиглаукоматозных препаратов бромидина и тимолол малеата. Было обнаружено, что дендримерный гидрогель является мукоадгезивным для частиц муцина на роговице. ПАМАМ-гидрогели были сшиты с полиэтиленгликоль диакрилатом (ПЭГА) для достижения гелеобразования местно при активации УФ-излучения [99].

Yu и его коллеги разработали сшитый ПЭГ с *in situ* гидрогелем для непрерывной доставки препарата, на примере Бевацизумаба. Он представляет собой - противоопухолевое средство [100]. Эта же группа, подготовила сшитые полисахаридные гидрогели с использованием гликолевого хитозана и окисленного альгината, для длительного освобождения Бевацизумаба [101]. Следуя исследованиям *in vitro* на клеточных культурах, обе системы являются перспективными для лечения внутриглазной неоваскуляризации. На рынке, примеры гелей, образующих *in situ*, включают препарат тимолола малеата на основе геллановой смолы и второй продукт тимолола, на основе метилцеллюлозы, цитрата натрия и ПЭГ [102].

Из вышеизложенного следует, что применение гелеобразующих растворов для доставки глазных лекарств, является весьма перспективным для дальнейших разработок.

### Пролекарства

Офтальмологические пролекарства обычно предназначены для достижения улучшения доставки лекарств или повышенного терапевтического индекса. После попадания пролекарства в ткани, оно должно метаболизироваться и вырабатывать активную форму лекарства. Пролекарства обычно химически синтезируются путём введения в состав активных молекул амидов, сложных эфиров или других ферментативно-расщепляемых химических связей. Ферменты в глазных тканях играют важную роль в превращении пролекарства в лекарство. Эстераза и амидаза являются наиболее распространенными ферментами в глазных тканях с высокой ферментативной активностью, обнаруженной в цилиарном теле, радужке, роговице [103,104]. Латанопрост является успешным глазным пролекарством с высоким уровнем проникновения, которое гидролизуеться через фермент эстеразу для получения активной формы лекарства [105].

Для оценки проницаемости роговицы и конъюнктивы для лекарственных средств, ориентированных на передний сегмент глаза, были оценены несколько стратегий с использованием пролекарств [106-119]. Некоторые из них представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Анализ исследований пролекарств для доставки в передний сегмент глаза

Пролекарство	Лекарство	Результат
1	2	3
Тимолол	Липофильные эфиры	Увеличение проницаемости роговицы Уменьшение системного лекарственного воздействия
Ацикловир	Алифатические ациловые эфиры Аминокислотные пролекарства Пептидные пролекарства Липидные пролекарства	Увеличение проницаемости роговицы Повышение стабильности Повышение эффективности Увеличение накопления клеток
Ганцикловир	Липофильные эфиры	Увеличение растворимости Увеличение проницаемости роговицы Увеличение активности
Дексаметазон	Эфиры	Увеличение проницаемости роговицы
Циклоспорин А	Фосфатный эфир	Терапевтические концентрации в прероговичной зоне непосредственно после применения
Флорбипрофен	Флорбипрофен аксетил	Меньше раздражения Увеличение эффективности

Продолжение таблицы 2

1	2	3
Агонист канабионидных рецепторов	Эфиры	Улучшение растворимости Увеличение проницаемости роговицы Повышенная окулярная биодоступность
Резолвин Е1	Метиловый эфир	Снижение нарушения роговицы

### Коллоидные системы доставки глазных лекарств

Различные типы коллоидных лекарственных форм были разработаны для увеличения времени пребывания препарата на поверхности роговицы и доставки в передний сегмент глаза. Некоторые из этих частиц могут взаимодействовать со слизистой оболочкой глаза и повышать проницаемость через роговицу и конъюнктиву. Полимерные наночастицы, наносуспензии, нанокристаллы, липосомы, ниосомы, кубосомы и дендримеры являются одними из наиболее изученных систем лекарственной доставки для заболеваний переднего сегмента, таких как сухость глаза, воспалительные процессы, глаукома, увеит и ретинопатия. Системы доставки коллоидных лекарств имеют преимущество поставлять различные лекарственные средства (в том числе и макромолекулы), обеспечивая стабильность лабильных препаратов и улучшая биодоступность в глазах [120].

В последние десятилетия был проведен ряд исследований, посвященных этим системам с различными глазными препаратами [121-128]. Классификация систем доставки коллоидных лекарств представлена в таблице 3. Несмотря на многообещающие результаты достижений с помощью этих систем для заднего сегмента глаза, имеются еще много проблем. Таким образом, еще предстоит исследовать сложные биомacroмолекулы, особенно в отношении доставки глазных лекарств.

Таблица 3- Коллоидные системы для доставки лекарств в передний сегмент глаза. Наночастицы

Лекарство	Компоненты	Модель патологии	Результаты
1	2	3	4
Ибупрофен	Eudragit RS100	Кролики с травмой глаза	Увеличение концентрации лекарства Хорошая переносимость in vivo
Индометацин	Хитозан	Кролики с язвой роговицы	Увеличение концентрации лекарства в роговице Лечение роговицы Хорошая переносимость in vivo
Циклоспорин А	Пропилен гликоль	Кролики	Концентрация лекарства в глазных тканях высокая Хорошая переносимость in vivo
Гатифлоксацин	Гиалуроновая кислота	Кролики	Увеличение биодоступности в глазах
Левовфлоксацин	Полилактил гликолиевая кислота	Кролики	Увеличение времени пребывания на роговице Хорошая переносимость in vivo

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4
Пилокарпин	Полилактил гликолиевая кислота	Кролики	Увеличение миотического ответа и продолжительности
Тимолол малеат	Гиалуроновая кислота, хитозан	Кролики с повышенным внутриглазным	Увеличение активности Снижение системного всасывания Хорошая переносимость <i>in vivo</i>
Ципрофлоксацин Гидрохлорид	Покрытый хитозаном	Кролики с конъюнктивитом	Увеличение активности Увеличение времени пребывания на роговице Хорошая переносимость <i>in vivo</i>

### Глазные импланты и пленки для переднего сегмента глаза

Глазные импланты и пленки предназначены для повышения биодоступности и обеспечения непрерывной доставки лекарств. Эти системы чаще всего помещают в конъюнктивальный мешок, под веко, переднюю камеру глаза, субконъюнктивальное пространство или эписклеральную часть для доставки в передний сегмент. Они могут быть в биоразлагаемой, либо в небiorазлагаемой форме. Ocusert была первой продаваемой глазной пленкой с низким содержанием пилокарпина, которая расширила терапевтический эффект в течении недели. Он состоит из 2 мембран сополимера этилена и винилацетата, которые контролируют высвобождение лекарственного средства [129].

Импланты, предназначенные для передней камеры, помещают во внутриглазную жидкость. Субконъюнктивальные или эписклеральные импланты требуют небольшого разреза в конъюктиве. Например, Surodex, представляет собой биоразлагаемый имплантат для передней камеры из поли-(молочно-со-гликолиевой кислоты), который поставляет дексаметазон в ткани глаза с замедленным высвобождением, примерно в течении 10 дней. Он был разработан для лечения и профилактики послеоперационного осложнения катаракты [130].

LX201 (Lux Biosciences) является эписклеральным имплантатом с силиконовой матрицей, включающий в себя циклоспорин А для поддержания высвобождения лекарственного средства в течении 1 года, чтобы предотвратить отторжение трансплантата роговицы. В 2012 году исследование III фазы было прекращено (идентификационный номер №00447187). В другом исследовании имплантата циклоспорина А для LX201 использовалась субконъюнктивальная имплантация, которая не влияла бы на неоваскуляризацию после кератопластики [131]. Имеется сообщение о том, что субконъюнктивальные импланты с циклоспорином А из поли-(молочно-со-гликолиевой кислоты) и поликонтактные импланты на основе поли-(ε-капролактона) были приготовлены для лечения синдрома сухого глаза с высвобождением в течении 2 месяцев и обеспечивают быстрое заживление сухого глаза в эксперименте на мышях [132]. Pfizer Inc. сотрудничал с проектом

по разработке субконъюнктивального импланта. Он был на основе поли- (молочно-со-гликолиевой кислоты) для латанопроста с замедленным высвобождением, для лечения глаукомы. Однако исследование I/II - а фазы (NCT01180062) также было прекращено из-за недостаточной доставки в ткани препарата.

Ученый Ang в 2014 г. разработал глазные микропленки преднизолон ацетата на основе поли- (ε-капролактона) для лечения увеита для субконъюнктивального применения. Исследования их проводились в эксперименте *in vivo* на кроликах с моделью патологии увеита. Результат этого исследования оказался более чем положительный [133]. Другой ученый Wong в 1989 г. опубликовал патент (US7846468) для биоразлагаемых имуннодепрессантных глазных имплантов с использованием поли- (молочно-со-гликолиевой кислоты) против отторжения имплантов. Было установлено, что эти системы способны предотвратить отторжение имплантов в передней камере глаза. Данные модели патологии были вызваны у крыс в эксперименте *in vivo* [134]. Лиофилизированные мини-таблетки в виде глазных имплантов, являются еще одним последним достижением, который имеет преимущества, такие как легкое и неинвазивное применение, увеличение времени пребывания на роговице и снижение потери лекарства через слезу. Производные целлюлозы, акрилаты и хитозан являются наиболее часто используемыми полимерами для составов глазных мини-таблеток [135].

### **Обтураторы слезных точек (Punctal plug)**

Малоизученные пролонгированные обтураторы слезных точек представляют собой небольшой биосовместимый материал, используемый для лечения синдрома сухого глаза путем вставления в слезный канал, тем самым блокируя слезный дренаж. Эти капсулы предоставляют такие преимущества, как неинвазивность и способность поддерживать устойчивое высвобождение лекарственного средства. Силикон, поли (гидрокси-этил-метакрилат), поли (капролактон) были одними из материалов, используемых для изготовления пролонгированных обтураторов, но они требуют удаления после полного высвобождения лекарственного средства [136]. Высвобождение лекарства из обтураторов слезных точек обычно контролируется диффузией, и лекарство можно нагружать в виде различных лекарственных форм, включая растворы, суспензии и коллоиды. Доказано, что одной из используемых схем для такой доставки является загрузка лекарства в непроницаемое ядро и высвобождение его из поперечного сечения, которое контактирует с поверхностью глаза или слезой. Этот альтернативный подход заключается в покрытии капсулой лекарственного раствора, однако высвобождение лекарства может быть низким из-за небольшой площади поверхности соприкосновения с глазом [137].

Исследования II фазы проводились для разработки состава пролонгированных капсул латанопроста и биматопроста для лечения глаукомы и глазной гипертензии компанией QLT Inc. и Vistacon Pharmaceutical [130, С. 218-221]. Система, используемая для латанопроста, также изучается для противоаллергического средства олопатадин. Еще один этап исследования для



этой лекарственной формы проведен для моксифлоксацина, с пролонгированным высвобождением для профилактики конъюнктивита после операции по удалению катаракты. Эта система достигла 7-дневного высвобождения лекарства в качестве потенциальной альтернативы актуальным антибиотикам-глазным каплям [138]. Gupta и его коллеги доказали, что в данную систему на основе поли (гидрокси-этил-метакрилата) насадили микрочастицы циклоспорина А для лечения синдрома сухого глаза. Эта пробка была покрыта силиконовой оболочкой и была в состоянии высвобождать лекарство более 3 месяцев [139].

Таким образом, obturators слезных точек, насыщенные лекарством, являются многообещающими для непрерывной доставки непосредственно на поверхность глаза. С другой стороны, их использование связано с некоторыми осложнениями, такими как конъюнктивит, болезненная слезливость, травма роговицы, закупорка слезной системы, отторжение. На эти осложнения могут повлиять размер, дизайн и способы доставки [140, 141]. Это доказывает, что предыдущие опыты в разработке данной глазной формы лекарства, приведут к появлению новых obturators слезных точек с меньшими осложнениями для доставки лекарства в переднюю камеру глаза.

#### **Контактные линзы**

На основании анализа установлено, что контактные линзы обеспечивают альтернативный подход к длительной доставке лекарств на поверхность глаза и за ее пределами. Полиметилметакрилат был широко используемым первым полимером для производства контактных линз, которые не могли обеспечить достаточное проникновение кислорода в роговицу и должны были удаляться на ночь. Это было ограничением для использования контактных линз в качестве пролонгированной системы доставки лекарств. Высокопроницаемые, гидрогелевые контактные линзы на основе силикона преодолели эту проблему, и контактные линзы теперь более перспективны, в качестве систем доставки лекарств [142, 143, 144].

Контактные линзы, пропитанные пилокарпином, были первым примером этих систем и сообщалось, что они обеспечивают снижение внутриглазного давления в течении нескольких часов с эквивалентной эффективностью глазных капель [145,146,147]. Впоследствии были протестированы *in vitro* контактные линзы, пропитанные кромолин-натрием, дексаметазон натрия фосфатом, кетотифен фумаратом и натамицином [148,149]. Загрузка коллоидных наночастиц и молекулярных включений также были исследованы как усовершенствованные методы загрузки лекарств для достижения длительного высвобождения, поскольку коммерческие контактные линзы способны высвобождать 1-2 часа [150]. Было доказано, что линзы с латанопростом [151] и с норфлоксацином [152] на основе поли (2-гидрокси-этил-метакрилата) способны обеспечить длительное высвобождение, также как силиконовые гидрогели с ципрофлоксацином [153].

Доказано, что контактные линзы, сшитые с Витамином Е могут обеспечить длительное высвобождение лекарства путем образования дополнительных

барьеров диффузии [154]. Нагрузка Витамином Е также эффективна для комбинированной терапии. В последних исследованиях, контактные линзы тимолола и дорзоламида с покрытием из Витамина Е были приготовлены для достижения одновременного длительного высвобождения двух препаратов, и результаты показали, что система способна снизить внутриглазное давление при низкой дозе препарата [155]. Основными ограничениями в системе доставки лекарств через контактные линзы, является их более высокая стоимость относительно глазных капель, окончательное принятие их и пациентами и клиницистами.

### **Интраокулярные линзы**

Разработаны интраокулярные линзы, сшитые с лекарством, в качестве альтернативы используемым в настоящее время послеоперационным лекарственным препаратам. Также были изучены биоразлагаемые полимерные кольца с триамцинолон ацетамидом, прикрепленные к диску интраокулярных линз и имплантированные в новозеландских белых кроликов, а результаты показали уменьшение воспалительных симптомов в водной среде до 7 недель [156]. В другом исследовании были исследованы многослойные внутриглазные линзы для непрерывной доставки лекарств [157].

Было доказано, что небiodeградируемое лекарственное кольцо, служит в качестве многоразового лекарственного депо для нескольких лекарств одновременно. Эта система должна быть размещена вокруг внутриглазной линзы после операции по удалению катаракты и может выполнить доставку в передний и задний сегменты глаза в зависимости от места нахождения полупроницаемой мембраны кольцевой капсулы лекарства. Эта система была изучена с использованием противоракового средства Бевацизумаба и показала полную кинетику высвобождения нулевого порядка [158].

### **1.5 Система доставки глазных лекарств через роговицу**

Электрофорез является неинвазивным методом, который использует электрический ток, контактирующий с тканями глаза, чтобы доставлять молекулы лекарства через биологическую мембрану. Устройство для электрофореза состоит из 2-х электродов: 1 содержит в себе раствор лекарства, 2-ой для замыкания электрической цепи и улучшения доставки лекарства либо электрофорезом, либо электроосмосом, либо электропорацией. Транскорнеальный электрофорез доставляет лекарство в передний сегмент глаза, тогда как транссклеральный в задний сегмент. Эффективность электрофореза обычно зависит от заряда лекарства, размещения электродов и длительности импульса [159,160].

Компания Eyegate разработала трансроговичную электрофорезную систему, изготовленных из мягкого силиконового каучука и вольфрамовых электродов. Раствор лекарственного средства помещают в вольфрамовый электрод и подают через силиконовые трубки. С помощью этой системы в клинических испытаниях были оценены лечение таких заболеваний как синдром сухого глаза, увеит, склерит [161]. Антибиотики, такие как гентамицин, ципрофлоксацин, тобрамицин поставляемые посредством

электрофореза, уменьшали уровень бактерий эффективнее по сравнению с традиционными каплями [162,163]. Дексаметазон при доставке с использованием трансроговичного электрофореза проявлял большее проникновение, чем положительно заряженные антибиотики. Используя электрофорез, рибофлавин может быть доставлен через неповрежденный эпителий роговицы (эпи-метод), чтобы вызвать сшивание коллагена при лечении кератоконуса [164]. Этот метод существенно сокращает время применения рибофлавина, и это может стать альтернативной терапией кератоконуса без удаления эпителия роговицы.

### **Выводы**

Из-за анатомических особенностей, барьеров и физиологических изменений глаза, вызванных характером различных заболеваний, эффективная доставка лекарственных препаратов была проблемой для лечения как переднего, так заднего сегмента. Ученые продолжают работать над новыми системами для повышения целевого доступа, степени доставки и продолжительности воздействия для повышения эффективности при одновременном снижении побочных эффектов, в надежде улучшить преимущества и удобства для пациентов.

В настоящее время системы пролонгированных лекарств, неинвазивные подходы для её улучшения и контактные линзы для увеличения времени экспозиции на поверхности глаза, имеют много перспектив для достижения желаемого результата. Несмотря на многообещающие исследования, развитие глазных капель для эффекта «cul de sac» остается самой серьезной проблемой. Для преодоления этой проблемы может потребоваться сочетание подходов и мультидисциплинарных усилий. Возрастающая дистанция между практическим здравоохранением и накапливающейся теоретической информацией в области биомедицинских исследований диктует необходимость профессионального контакта между врачами-клиницистами и научными работниками во многих областях с целью активной трансляции современных фундаментальных исследований, проясняющих механизмы основных метаболических процессов и их нарушений, для эффективной медицинской помощи конкретному пациенту. Поэтому фундаментальные науки, включая понимание моделей патологии животных и людей, имеют решающее значение для улучшения предсказуемости клинических исходов на основе доклинических исследований. Для создания новых мукоадгезивных офтальмологических препаратов и генной терапии, необходимо создать функциональную сеть между учеными, клиницистами, регулирующими органами и представителями промышленности.

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Организация исследования

В диссертации представлен объем научных исследований данных экспериментов *in vivo* на кроликах с моделью патологии роговицы в виде гнойной язвы. Работа проводилась в период с 2015 по 2018 гг. в ОУНЛ ГМУ г. Семей, Школе Фармации университета Рединг, Великобритании, кафедре патанатомии ГМУ г. Семей, бактериологической лаборатории КГКП «Инфекционная больница г. Семей» и научной лаборатории университета Шакарима г. Семей.

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

1. Разработка и изготовление модификации ГЛП с ципрофлоксацином на основе ПАК и МЦ;
2. Разработка и изготовление глазных капель на основе Pluronic F127 и F68;
3. Изучение удерживаемости ГЛП и гелеобразующего раствора;
4. Изучение переносимости ГЛП и гелеобразующего раствора, содержащих ципрофлоксацин;
5. Насыщение МКЛ ципрофлоксацином;
6. Оценка терапевтической эффективности ГЛФ на модели экспериментальной гнойной язвы роговицы кроликов;
7. Оценка результатов микробиологических исследований;
8. Патоморфологическое исследование роговиц кроликов до и после лечения различными ГЛФ-ми;
9. Сравнительный анализ концентрации ципрофлоксацина в роговице глаза животных при применении ГЛП, глазных капель, глазных лекарственных растворов, мягких контактных линз;
10. Обоснование применения гелеобразующих глазных лекарственных растворов для профилактики инфекционных осложнений.

Таблица 4 - Основные исследования, задачи и методы исследования

Исследование	Задачи	Методы
1	2	3
Спектрофотометрические	Исследование десорбции ЦФ в ПКГ	Спектрофотометрия
Микробиологические	Определение <i>Staphylococcus aureus</i> в видовом составе микрофлоры конъюнктивы	Бактериологический Метод
Экспериментальные	Исследование переносимости (местная, общая) и влияния на состояния глаза ГЛФ с ципрофлоксацином Оценка терапевтической эффективности ГЛФ на модели экспериментальной гнойной язвы роговицы кроликов	Биомикроскопия Визуальное обследование

Продолжение таблицы 4

1	2	3
Хроматографические	Проведение сравнительного анализа содержания ЦФ в ПКГ	Высокоэффективная жидкостная хроматография

Глазные лекарственные формы, используемые в данном исследовании, представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Виды глазных лекарственных форм, используемых в эксперименте

Разновидность ГЛФ	Содержание ЦФ в ГЛФ
ГЛП на основе ПАК и МЦ в соотношении 30/70	0,3
Глазные капли компании Доктор Редди'с Ципролет	0,3
Гелеобразующие растворы с ЦФ	0,3
Мягкие контактные линзы	0,3
Коммерческие ГЛП на основе ПВП	0,3

### 2.1 Характеристика объектов исследования

В работе использовались полиакриловая кислота (ПАК, Mw 450000), рибофлавин, натриевая соль флюоресцеина, а также гидроксид натрия, которые были приобретены в компании Sigma-Aldrich (Великобритания). Метилцеллюлоза (МЦ, Mw 93000, с 28-30 % содержанием метильных групп) была куплена в компании Fluka (Великобритания). Триблок-сополимеры полиэтиленгликоль-блок-полипропилен-гликоль-блок-полиэтиленгликоль (ПЭГ-ППГ-ПЭГ) марки Pluronic F127 и Pluronic F68 были предоставлены компанией BASF (Германия). Концентрированные водные растворы (20 %) триблок-сополимеров ПЭГ-ППГ-ПЭГ, доступные коммерчески как Pluronic F127 и Pluronic F68, обладают уникальной способностью к образованию прозрачных гелей при повышении температуры. В зависимости от типа полимера (Pluronic F127 или Pluronic F68) образование гелей происходит при разных температурах. Особенный интерес представляет Pluronic F127, растворы которого образуют прозрачные гели при температуре близкой к физиологическим условиям.

Фармакологически-активный препарат, растворенный в 20 % растворе Pluronic F127 при низкой температуре (5°C температура в холодильнике), представляет собой жидкость с низкой вязкостью. Этот раствор может быть легко закапан в глаз, при этом резкое повышение температуры до физиологической приводит к моментальному формированию вязкого геля *in situ* на поверхности роговицы. Образовавшийся гель способствует более длительному удерживанию препарата в пре-роговичном пространстве и дает возможность лекарственному веществу для более длительного всасывания.

Пленки, содержащие рибофлавин готовились путем смешения водных растворов ПАК и МЦ при pH 4.0, растворения в них рибофлавина и последующего высушивания на воздухе. Пленки, содержащие ЦФ готовились

путем смещения ПАК и МЦ при pH 6.5. Мягкие контактные линзы были приобретены в оптике Acuvue Oasys, производства США. ГЛП на основе ПВП с ципрофлоксацином приобретены в Республике Башкортостан (Всероссийский глазной центр имени Э.Мулдашева).

### **Животные**

В настоящее исследование были включены животные - половозрелые кролики породы Шиншилла, которые находились в условиях вивария ОУНЛ ГМУ г. Семей. Вес кроликов варьировал в диапазоне 2500-3500 граммов. Условия содержания, питания, гигиены животных были в отдельно отведенных помещениях для группового содержания. Данные помещения имеют самостоятельную приточно-вытяжную вентиляцию, обеспечивающую обмен воздуха не менее 12-15 объемов/час. В помещениях вивария осуществляется контроль микроклимата по показателям, которые необходимы для получения достоверных результатов эксперимента: температура равная 15-18 °С, относительная влажность в пределах 50-65 % поддерживается в течении всего года.

Кролики породы Шиншилла – широко используются для проведения фармакологических наблюдений. Они служат прекрасным биологическим объектом для оценки глазных лекарственных форм, потому что отличаются от других лабораторных животных своим спокойствием и относительно слабой сопротивляемостью при фиксации. При выполнении данной исследовательской работы на орган зрения было использовано устройство для фиксации кроликов, предложенное Э.М.Мироновой и соавторами в 1976 г. - индивидуальный деревянный бокс, с прорезью в передней стенке [165]. При этом голову животного сквозь отверстие передней стенки выводили наружу, а туловище размещали внутри этого бокса (рисунок 1).

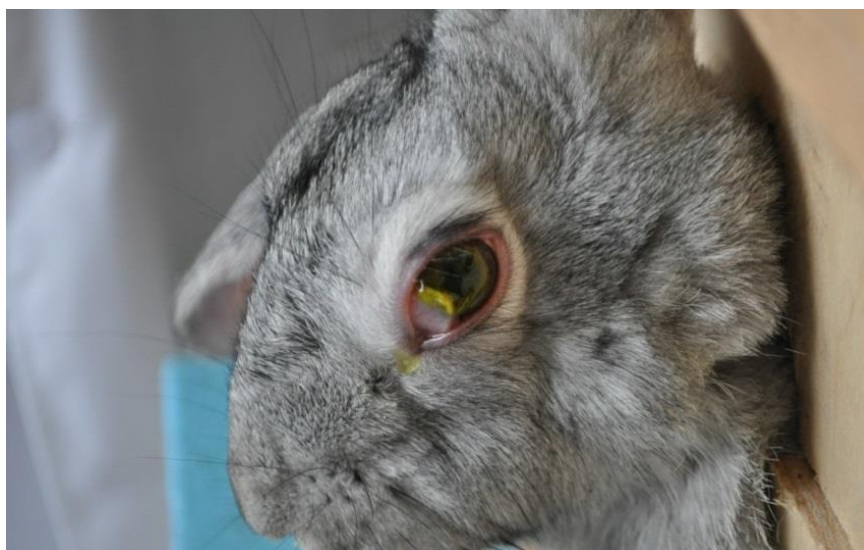


Рисунок 1- Устройство фиксации кролика с выведением головы наружу

## 2.2 Методология разработки глазных лекарственных пленок на основе полиакриловой кислоты и метилцеллюлозы с рибофлавином и ципрофлоксацином

Разработанные новые ГЛП были изготовлены в химической лаборатории школы Фармации университета Рединг, Великобритании (PhD-докторант кафедры фармакологии ГМУ г. Семей Ожмухаметова Э.К., научный сотрудник Калдыбеков Д.).

В качестве основ для глазных лекарственных пленок использовали пленкообразующий водорастворимый полимер - метилцеллюлозу и полиакриловую кислоту. Данные матрицы являются безопасными, биосовместимыми и нетоксичными. Глазная пленка содержит ципрофлоксацин-фторхинолон последнего поколения. Кроме того, использованный антибиотик является лечебной формой, активно применяемой в клинической практике в виде глазных капель 0,3% -Ципролета компании «Доктор Редди'с».

В качестве антибактериального препарата нами был использован 0,3% раствор ципрофлоксацина (действующее вещество – ципрофлоксацин 3,45 мг). Физико-химические свойства представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Физико-химические свойства ципрофлоксацина

Свойства	Показатели
Концентрация в растворе мг/мл	3,0
рН	6,8
Молекулярная масса, г/моль	331,3
Растворимость в воде, мг/мл	30

Предлагаемую глазную лекарственную пленку изготавливали в асептических условиях. В стеклянной колбе приготовили водный раствор ПАК ( $M_w$  450000), МЦ ( $M_w$  93000) и в течение ночи оставили перемешиваться на магнитной мешалке для получения гомогенного раствора. После чего добавили 1,5 грамма ципрофлоксацина в 50 мл заранее приготовленного раствора ПАК/МЦ в соотношении 30/70. Полученную смесь перемешивали в течение 60 минут при температуре 25°C. Затем раствор полимера с ципрофлоксацином выливали на поверхность стерильного стекла для высушивания при температуре 70°C в термостате [166]. Из полученных пластин с помощью штампа вырезали глазные лекарственные пленки необходимого размера 10 мм, которые упаковывались и подвергались стерилизации. После изготовления пленки мягкие, гибкие. При помощи микрометра измеряли толщину пленок, которая составила 0,5 мм.

Комитетом по вопросам этики ГМУ г. Семей дано разрешение на производство ГЛП с ципрофлоксацином на основе ПАК и МЦ, проведение экспериментальных исследований на лабораторных животных с использованием разработанных ГЛП.

### **2.3 Методология разработки гелеобразующих растворов с Pluronic F68 и F127 для глаза и изучения удерживаемости в эксперименте *in vivo***

В данной работе мы использовали два полимера Pluronic F127 и F68 в качестве наполнителей для приготовления гелевых систем *in situ* для применения на глазах. В качестве модельного фармакологического препарата использовался флюоресцеин натрия для изучения потенциала раздражения слизистой глаз и удержания на роговице.

Глазные капли были приготовлены путем растворения 20 об % Pluronic F127 и Pluronic F68 в 1 мг/мл растворах флюоресцеина натрия на основе сверхчистой дистиллированной воды при температуре 4°C и перемешивались в течении 12 часов (в темное время суток-важно для флюоресцеина). После полного растворения данный раствор был готов к применению через 12 часов.

Растворы, содержащие Pluronic F127/Pluronic F68 и флюоресцеин натрия объемом 70 микролитров, также закапывались на поверхность роговицы. Во всех экспериментах использовались оба глаза кроликов. Благодаря интенсивной желтой окраске рибофлавина и флюоресцеина, их удерживаемость на поверхности глаза контролировалась визуально и при помощи фотографирования с использованием фотоаппарата iSlim 2020AF (KYE Systems Corp., Taiwan). В случае с исследованием глазных капель также отбирались пробы слезной жидкости при помощи тампонов (Ola! Silk Sense, Российская Федерация) путем легкого касания предварительно взвешенного тампона нижней части роговицы. Далее взятая проба взвешивалась на аналитических весах, экстрагировалась в 2 мл 90 об % этанола (компания Ромат, Казахстан) в течении 1 часа, центрифугировалась в течении 10 мин при 8000 оборотов/с и анализировалась на спектрофотометре PD-303S (Apel Co Ltd, Japan) при  $\lambda=490$  нм. Концентрация флюоресцеина в слезной жидкости определялась при помощи калибровочной кривой. Каждый эксперимент повторялся на 5-ти (10 глаз) разных кроликах.

#### **Спектрофотометрический метод**

Методом УФ-спектрофотометрии разработана методика оценки удерживаемости на поверхности глаза лекарственных веществ на примере модельного флюоресцеина [88, С. -110]. УФ спектры растворов записаны при температуре 25°C на спектрофотометре PD-303S (Apel Co Ltd, Japan) в диапазоне 200-900 нм (рис.2).

Заранее взятые пробы взвешивалась на аналитических весах, экстрагировалась в 2 мл 90 об % этанола (компания Ромат, Казахстан) в течении 1 часа, центрифугировалась в течении 10 мин при 8000 оборотов/с и анализировалась на спектрофотометре PD-303S (Apel Co Ltd, Japan) при  $\lambda=490$  нм. Перед началом эксперимента проводили определение коэффициента поглощения, затем с помощью калибровочного графика устанавливали содержание флюоресцеина в растворах.

Подготовка калибровочной кривой (таблица 7): из расчета 1мг/мл подготовлен раствор флюоресцеина в дистиллированной воде. 25 мг



флуоресцеина разводили в 25 мл воды, что послужило образованию стартового раствора: 10 мл-0,1%.

Таблица 7- Построение калибровочной прямой

Разведение растворов	Раствор, %
10 мл исходного раствора	0.1%
5 мл 0,1% + 5 мл дистил воды	0,05%
5 мл 0,05% + 5 мл дистил воды	0,025%
5 мл 0,025% + 5 мл дистил воды	0,0125%
5 мл 0,0125% + 5 мл дистил воды	0,00625%
5 мл 0,00625% + 5 мл дистил воды	0,003125
5 мл 0,003125% + 5 мл дистил воды	0,0015625%
5 мл 0,0015625% + 5 мл дистил воды	0,00078125%

Глазные лекарственные капли с ципрофлоксацином были приготовлены аналогичным способом из расчета 3 мг/мл. В заранее приготовленный 20 об. % Pluronic F127 или Pluronic F68 объемом 100 мл добавили 3,0 грамма ципрофлоксацина и оставили перемешиваться при температуре 5 °С на ночь в течении 10-12 часов до приобретения однородного прозрачного раствора.

Для реализации метода изучения удерживаемости гелеобразующего раствора и ГЛП использовались по 5 кроликов (10 глаз) для каждой формы: всем 35 кроликам (70 глаз) – накладывали ГЛП, содержащими рибофлавин и закапывали раствор *in situ gel* на основе полимеров Pluronic F127 и F68. Процесс смывания фиксировался визуально и при помощи фотографирования с использованием фотоаппарата iSlim 2020AF (KYE Systems Corp., Taiwan).

#### **2.4 Методология насыщения МКЛ ципрофлоксацином**

Коммерческие мягкие контактные линзы Acuvue Oasys (Hydraclear Plus) без диоптрия пропитывали ЦФ, соответствующие 0,3% антибактериальным глазным препаратам. Основой линзы является силикон-гидрогель, влагосодержание которого соответствует 38%. Насыщали в 3,0 ЦФ из расчета на 100 мл очищенной воды. На 1 линзу необходимо 2,5 мл исходного раствора. Сначала помещали линзы в буферный раствор на 6-8 часов для высвобождения фабричных наполнителей. Затем промывали в дистиллированной воде и сушили. Для пропитки антибиотиком, все линзы помещали на 18 часов в 0,3% раствор ЦФ, 1 линза находилась в 2 мл приготовленного раствора в стерильном пластиковом контейнере с плотно закрывающейся крышкой.

#### **2.5 Методология изучения переносимости (местной и общей), влияния на состояние глаз кроликов ГЛП на основе ПАК/МЦ и гелеобразующего раствора на основе Pluronic F127**

Изучение переносимости и влияния на функциональное состояние глаза ГЛП с ЦФ проводилось на 12 кроликах по стандартной методике. Ежедневно в течении 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 с ЦФ-ном. В 4-ой группе кроликам накладывали на поверхность глаза ЛМКЛ с ЦФ-ном.

На протяжении эксперимента общую переносимость ГЛФ с ципрофлоксацином изучали по следующим параметрам: характер поведения (агрессивность, вялость), внешний вид, состояние шерстного покрова, слизистых оболочек, температура тела, аппетит, характер выделений, изменение веса, время удерживания на поверхности глаза.

## **2.6 Методология моделирования экспериментальной гнойной язвы роговицы и изучение эффективности лечения различными глазными лекарственными формами, содержащими ципрофлоксацин**

Методы исследования терапевтической эффективности различных ГЛФ с ЦФ на модели гнойной язвы роговицы. Для исследования терапевтического эффекта ГЛФ с антибиотиком нами реализована экспериментальная модель гнойной язвы роговицы у 60 кроликов (60 глаз).

Экспериментальная гнойная язва роговицы вызывалась путем нанесения травмы по методике адаптированной из работ Колесникова [167]. Необходимая модель патологии роговицы согласно данной методике не вызывала выраженного воспалительного процесса для изучения новых мукоадгезивных лекарственных форм с ЦФ. В других экспериментальных работах имеется информация о занесении бактерий стафилококка в глаза, которые в последующем вызывали гнойный конъюнктивит различной степени тяжести. Поэтому нами была оптимизирована модель патологии роговицы у экспериментальных животных, где после травмирования заселяли КОЕ золотистого стафилококка, что вызвало ярковыраженный гнойно-воспалительный процесс с дефектом роговицы и образованием грозного осложнения в виде бельма. При нанесении травмы кролики находились в специальной деревянной коробке с отверстием для головы. После местной анестезии 0,04% раствором иннокaina (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 [168]. Далее в полученный дефект втирали 1 стандартную петлю ( $10^7$ – $10^8$  КОЕ) чистой культуры золотистого стафилококка [169]. Через сутки на всех экспериментальных глазах развивались типичные гнойные язвы роговицы.

Стафилококк для эксперимента был взят из бактериологической лаборатории Казенного государственного коммунального предприятия «Инфекционная больница г. Семей» (Республика Казахстан), который был выращен на скошенной желточно-солевой среде в течении 3-х суток. Далее через сутки после вызванной травмы глаза, ежедневно делали мазок

стерильным ватным тампоном и транспортировали в течении 12 часов в лабораторию в стерильной пробирке в молочно-солевой среде. В ходе эксперимента пробирка после забора материала содержалась в термостате при температуре 37 °С. С доставкой пробирки в лабораторию в течении 2-х часов содержимое пересеивали штрихом для обильного роста на желточно-солевой агар и затем помещали в термостат при 37 °С на 2-е суток. В течении этого времени бактерии образовывали колонии, окруженные зоной полного гемолиза, которые имели золотистый оттенок. При хорошем освещении их можно увидеть в виде радужного венчика. На 3-м этапе из выросших колоний делали мазок на предметном стекле для окрашивания по Граму и микроскопирования. При наличии в мазке чистой культуры стафилококка, оставшуюся часть пересеивали на мясопептонный агар для идентификации со стрептококком (проба на каталазу - стафилококк выделяет пузырьки) [169, С. -250]. Готовые колонии стафилококка представляли собой округлые диски средней величины, гомогенной или мелкозернистой формы.

Ежедневно проводили осмотр, наблюдение за поведением и общим состоянием кроликов. Показателями воспалительного процесса служили: блефароспазм, состояние кожи век, характер отделяемого с конъюнктивальной полости, гиперемия сосудов конъюнктивы, состояние роговицы, прозрачность ВПК.

Исследование проводилось для оценки терапевтической эффективности различных ГЛФ на модели экспериментальной гнойной язвы роговицы (70 кроликов (70 глаз)). Распределение кроликов по группам отражено в таблице 8 и в эксперимент брали всегда один глаз кролика. Экспериментальные животные содержались в строго идентичных условиях.

Таблица 8 – Распределение кроликов по группам для изучения эффективности лечения

№ группы	Кол-во кроликов	Применяемая глазная лекарственная форма
1 контрольная	10	Без патологии и без лечения
2 экспериментальная	10	С патологией и без лечения
3 экспериментальная	10	С патологией и лечение глазными каплями Ципролет 0,3% (Доктор Редди'С)
4 экспериментальная	10	С патологией и лечением гелеобразующим раствором Pluronic F127 с ЦФ
5 экспериментальная	10	С патологией и лечением ЛМКЛ с ЦФ
6 экспериментальная	10	С патологией и лечением ГЛП на основе ПАК/МЦ
7 экспериментальная	10	С патологией и лечением ГЛП на основе ПВП-на с ЦФ

По окончании эксперимента животных выводили из опыта под тиопенталовым наркозом методом воздушной эмболии – через краевую вену уха вводили нембутал из расчета 10 мг/кг веса и 10 мл воздуха. В последующие

10-15 минут производили энуклеацию глазного яблока. Извлеченные роговицы помещали в 1% раствор формалина для дальнейшего изучения патоморфологических изменений на роговице. Экспериментальные исследования проводились с соблюдением общепринятых принципов гуманности и существующих международных нормативных документов в соответствии с «Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, принятой Советом Европы (Страсбург, Франция 1986г); Директивой Совета 86/609 ЕЕС от 24.11.1986г. «По согласованию законов, правил и административных распоряжений стран участниц в отношении защиты животных, используемых в экспериментальных и научных целях»; инструкций приказа Министерства Здравоохранения Республики Казахстан [170,171]; рекомендациям этического комитета Государственного Медицинского университета г. Семей [172].

## **2.7 Методология микробиологического, морфологического и хроматографического методов исследования**

Микробиологические исследования были проведены на базе бактериологической лаборатории Казенного Государственного коммунального предприятия «инфекционная больница г. Семей» (заведующий лабораторией Меримгалиева А.К.).

Исследование микрофлоры конъюнктивальной полости

Для решения поставленных задач нами было обследовано 60 пар глаз кроликов (600 мазков) с моделью патологии роговицы и 10 пар глаз кроликов (100 мазков) без патологии. Все животные находились в одинаковых условиях содержания и кормления. Всем кроликам проводилось стандартное обследование. Исследование материала полости конъюнктивы у всех животных проводилось без патологии роговицы, с патологией роговицы без лечения и с лечением на протяжении 10-ти дней. Выделение и идентификацию *Staphylococcus aureus* осуществляли методами, принятыми в бактериологической практике. Высеивание стафилококка определяли на мясопептонном агаре (МПА) дискодиффузным методом в соответствии с методическими рекомендациями [173].

МПА является универсальной питательной средой для выращивания большинства патогенных микроорганизмов. Мясопептонный агар приготовили по следующей методике. В качестве основы для МПА использовали готовый стандартный мясопептонный бульон производства НИЦФ. Реакцию среды устанавливали не ниже 8,2 единиц. Затем к 100 мл мясопептонного бульона добавляли 4 г 2 % морской водоросли агар-агара. Емкость с приготовленным раствором закрывали стерильным ватно-марлевой пробкой. Стерилизация проводили в автоклаве при 1,1 атм (120°C) в течении 30 минут. Готовый МПА имеет точку плавления 100°C и температуру застывания около 40°C.

Через сутки после вызванной травмы глаза и затем ежедневно в течении 10 дней делали мазок стерильным ватным тампоном, и материал транспортировали в течении 12 ч в лабораторию в стерильной пробирке с

молочно-солевой средой. В ходе эксперимента пробирку после забора материала содержали в термостате при температуре 37°C. С доставкой пробирки в лабораторию в течении 2-х часов содержимое пересевали штрихом для обильного роста на МПА в чашки Петри, толщиной в 4 мм, и затем помещали в термостат при 37 °C на 2-е суток. В течении этого времени бактерии образовывали колонии, окруженные зоной полного гемолиза, которые имели золотистый оттенок. При хорошем освещении их можно увидеть в виде радужного венчика. На 3-м этапе из выросших колоний делали мазок на предметном стекле для окрашивания по Граму и микроскопирования. При наличии в мазке чистой культуры стафилококка оставшуюся часть пересевали на новый мясо-пептонный агар для идентификации со стрептококком (проба на каталазу - стафилококк выделяет пузырьки). Готовые колонии стафилококка представляли собой округлые диски средней величины, гомогенной или мелкозернистой формы.

Для исследования морфологических изменений на глазах с гнойной язвой роговицы, глазные яблоки разрезали по экватору и отделяли непосредственно роговицу. Потом ее фиксировали в 10% раствор 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 «Судебно-медицинской экспертизы».

#### **Методология оценки биодоступности ципрофлоксацина в роговице**

Было проведено изучение особенностей фармакокинетики 0,3% глазных капель Ципролет компании «Доктор Редди'с», ГЛП на основе ПАК и МЦ с ЦФ, гелеобразующего раствора на основе Pluronic F127 с ЦФ, МКЛ «Acuvue Oasys», пропитанных ЦФ-ном, коммерческих ГЛП с ЦФ при инстилляционном и субконъюнктивальном введении.

Целью данного этапа исследования стала разработка методики хроматографического анализа и расчетывание времени максимальной концентрации исследуемого препарата в роговице глаз кроликов и его период полувыведения. Исследование проведено на 30 кроликах (60 глаз) породы Шиншилла массой 2,5-3,0 кг.

В ходе эксперимента животные были разделены на 5 равнозначных групп по 6 кроликов (12 глаз) в каждой группе соответственно применяемой ГЛФ-ме, следующим образом:

Взятые после выведения животных из эксперимента роговицы глаз, использовали для проведения качественного хроматографического анализа.

1 группа (6 кроликов (12 глаз)) – перед исследованием всем кроликам в оба глаза закапывали 2 капли 0,3% раствора Ципролет. Животные были распределены в 2 одинаковые группы – по 3 кролика (6 глаз) в каждой группе в соответствии со сроками анализа содержания ЦФ-на в роговице, который проводили через 30, 60 минут после введения препарата.

2 группа (6 кроликов (12 глаз)) – всем кроликам закапывали гелеобразующий раствор на основе Pluronic F127, содержащим ЦФ в объеме 70 мкл. Животные были распределены в 2 одинаковые группы – по 3 кролика (6 глаз) в каждой группе в соответствии со сроками анализа содержания ЦФ-на в роговице, который проводили через 30, 60 минут после введения препарата.

3 группа (6 кроликов (12 глаз)) – всем кроликам на роговицу накладывалась ГЛП на основе ПАК и МЦ, содержащим ЦФ. Животные были распределены в 2 одинаковые группы – по 3 кролика (6 глаз) в каждой группе в соответствии со сроками анализа содержания ЦФ в роговице, который проводили через 30, 60 минут после введения препарата.

4 группа (6 кроликов (12 глаз)) – всем кроликам накладывалась МКЛ без диоптрия, пропитанная ЦФ. Животные были распределены в 2 одинаковые группы – по 3 кролика (6 глаз) в каждой группе в соответствии со сроками анализа содержания ЦФ в роговице, который проводили через 30, 60 минут после введения препарата.

5 группа (6 кроликов (12 глаз)) – всем кроликам накладывалась в субконъюнктивальную полость коммерческая пленка с ЦФ. Животные были распределены в 2 одинаковые группы – по 3 кролика (6 глаз) в каждой группе в соответствии со сроками анализа содержания ЦФ в роговице, который проводили через 30, 60 минут после введения препарата.

Выведение животных из эксперимента осуществляли путем введения в краевую вену уха раствора тиопентал натрия из расчета 10 мг/кг веса с последующим введением 10 мл воздуха. Далее энуклеировали глазные яблоки и замораживали при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ , для чего их опускали в емкость с жидким азотом на 2-3 минуты. После заморозки проводили последовательное выделение роговицы, после чего помещали в стерильные пробирки и хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  в емкости с сухим льдом.

Далее с помощью ВЭЖХ в ее обращенно-фазовом варианте проводили анализ полученных проб.

Использовался хроматограф Stayer фирмы Acvilon, включающий в себя флуориметрический детектор с кварцевой галогеновой лампой [174]. Контроль над процессом хроматографии и анализ полученных данных хроматограмм осуществлялся с использованием компьютерной программы Мультихром. При анализе использовалась разделительная колонка – Phenomenex luna 5u  $\text{C}^{18}$  с защитным картриджем, заполненная сорбентом, бидистиллированной водой, ацетонитрилом [174 С.373-381, 175], ацетатным буфером. Объем вводимой пробы составлял 20 мкл, скорость потока 1мл/мин.

Известно, что использование организованных сред, в составе подвижных фаз (ПФ) в некоторых случаях позволяет избежать применения токсичных растворителей, повысить интенсивность аналитического сигнала и сократить время разделения [176].

Анализ экстрагированной роговицы проводили следующим образом: к предварительно взвешенному образцу роговицы добавляли 0,2 мл бидистиллированной воды, измельчали и проводили экстракцию в

Ультразвуковой ванне 5 в течении 2-х часов. Полученный раствор фильтровали через фильтр (6 мк) и анализировали.

Реагенты, использованные в данном исследовании

Растворы всех основных и вспомогательных химических реагентов готовились на бидистиллированной воде. Антибиотик – ципрофлоксацин содержит не менее 98% основного вещества, длина волны ЦФ составляет 277 нм. Исходный раствор ципрофлоксацина 0,25 мг/мл приготовили растворением 0,0125 грамм порошка, с содержанием основного вещества 98% в 50 мл дистиллированной воды. Также использовали водный раствор  $\gamma$ -циклодекстрина (ЦД) («Fluka») с содержанием основного вещества не менее 98%. Раствор  $\gamma$ -циклодекстрина концентрации  $1 \cdot 10^{-2}$  М приготовили растворением в 25 мл дистиллированной воды 0,0324 г сухого вещества, содержащего не менее 98% основного компонента. Для построения градуировочного графика в каждую из 8-ми пробирок вносили 1 мл ацетатно-аммиачного буферного раствора. 0,25 мл  $5 \cdot 10^{-5}$  М  $\gamma$ -циклодекстрина, затем различные объёмы исходного раствора ципрофлоксацина в диапазоне концентраций от 0,1-100 мкг/мл, разбавляли буферным раствором до общего объёма 5 мл и из каждой пробирки отбирали аликвоту 50 мкл, которую вводили в хроматограф. Для приготовления подвижной фазы использовали ацетонитрил («Panteas») с содержанием основного вещества 99,9% [177]. Ацетатно-аммиачные буферные растворы приготовили из 2М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

Качественный анализ проводили по времени удерживания препарата, которое составило 2 минуты. Условия анализа приведены в таблице 9.

Таблица 9 - Основные условия хроматографического анализа ЦФ-на

Препарат	Длина волны детектора, (нм)	Используемая колонка	Элюент
Ципрофлоксацин		Диасфер $\text{C}^{18}$ (4×150 мм)	Ацетонитрил: ацетатно-аммиачный буфер (pH 3,0-8,0) Щавелевая кислота (pH-2,5)

## 2.8 Методы статистической обработки результатов исследования

Статистическая обработка проводилась с помощью пакета прикладных программ SPSS и программного обеспечения Microsoft Office XP. Для графического изображения использованы пакеты SPSS, 23 версии и Microsoft Excell 2010.

При анализе количественных данных, проводилась проверка на правильность распределения признака в экспериментальных группах, с визуальной оценкой и применением критерия Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения признака, среднее значение представлено среднеарифметическим М (Mean), с указанием 95% доверительного интервала (95ДИ) или стандартного отклонения (SD). Если распределение признака имело

характер отличный от нормального, в качестве центральной меры были использованы показатель медианы (Me) и межквартильные интервалы (Q1; Q3). Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Статистическая обработка результатов температурных данных, КОЕ: была использована описательная статистика, разведочный анализ, ANOVA, 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 [178].

Для оценки величины эффекта качественных данных: гиперемии, гнойного отделяемого, отека, слезотечения, мы использовали анализ таблиц сопряженности на уровне критериев  $\tau_{a-b}$ ,  $\tau_{a-c}$  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 мы использовали также описательную статистику, разведочный анализ, ANOVA с указанием достигнутого уровня значимости с поправкой Бонферони. Для статистического описания всех результатов использовали табличное и графическое представление данных.



### 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 3.1 Характеристика полученных глазных лекарственных пленок и гелеобразующих растворов

В лабораториях Школы Фармации университета Рединга (Великобритании) были получены новые ГЛП с ципрофлоксацином, флуоресцеином и рибофлавином.

Внешне полученные глазные пленки с ципрофлоксацином на основе ПАК и МЦ представляют собой прозрачные с лимонно-желтоватым оттенком, овальные, твердо-эластичные пластинки с ровными краями и гладкой поверхностью (рис 2). Глазные пленки с рибофлавином для оценки удерживаемости представляли собой округлой формы твердо-эластичные с ярко-желтым оттенком и ровными краями пластинки (рис 3).

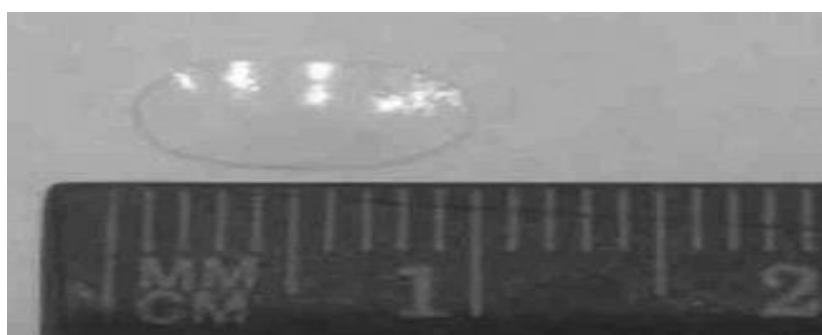


Рисунок 2- Глазная пленка с ЦФ на основе ПАК и МЦ

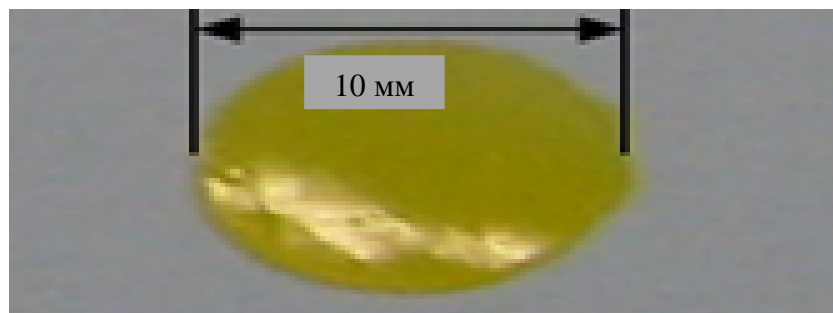


Рисунок 3- Глазная пленка с рибофлавином на основе ПАК и МЦ

Параметрические данные глазных пленок с ЦФ и рибофлавином представлены в таблице.

Таблица 10 - Параметры глазных пленок на основе ПАК и МЦ

Тип ГЛП	Длина, мм	Ширина, мм	Толщина, мм	Масса, гр
ГЛП на основе ПАК/МЦ -30%/70% с ЦФ	9,0	4,0	0,5	0,015

Продолжение таблицы 10

1	2	3	4	5
ГЛП на основе ПАК/МЦ 30%/70% с рибофлавином	10,0	4,0	0,5	0.015

На 1 см<sup>2</sup> глазной пленке количество ПАК и МЦ составило 0,022 и 0,018 грамм соответственно. В одной готовой лекарственной форме содержалось 0,3 г ЦФ. При снижении количества антибактериального препарата менее 0,3 г терапевтический эффект проявляется недостаточно. Увеличение дозы более 0,3 г является нецелесообразным.

Для изучения лекарственной формы, образующей гель на поверхности глаза, нами были приготовлены 3 мг/мл раствор ципрофлоксацина в 20 % растворе Pluronic F127 [179,87- С. 108]. Внешне раствор представлял собой прозрачную жидкость, без патологических взвесей, который при температуре 35°C на поверхности глаза образовывал гель. Рисунок 4 показывает превращение раствора из жидкого состояния в гелеобразное.

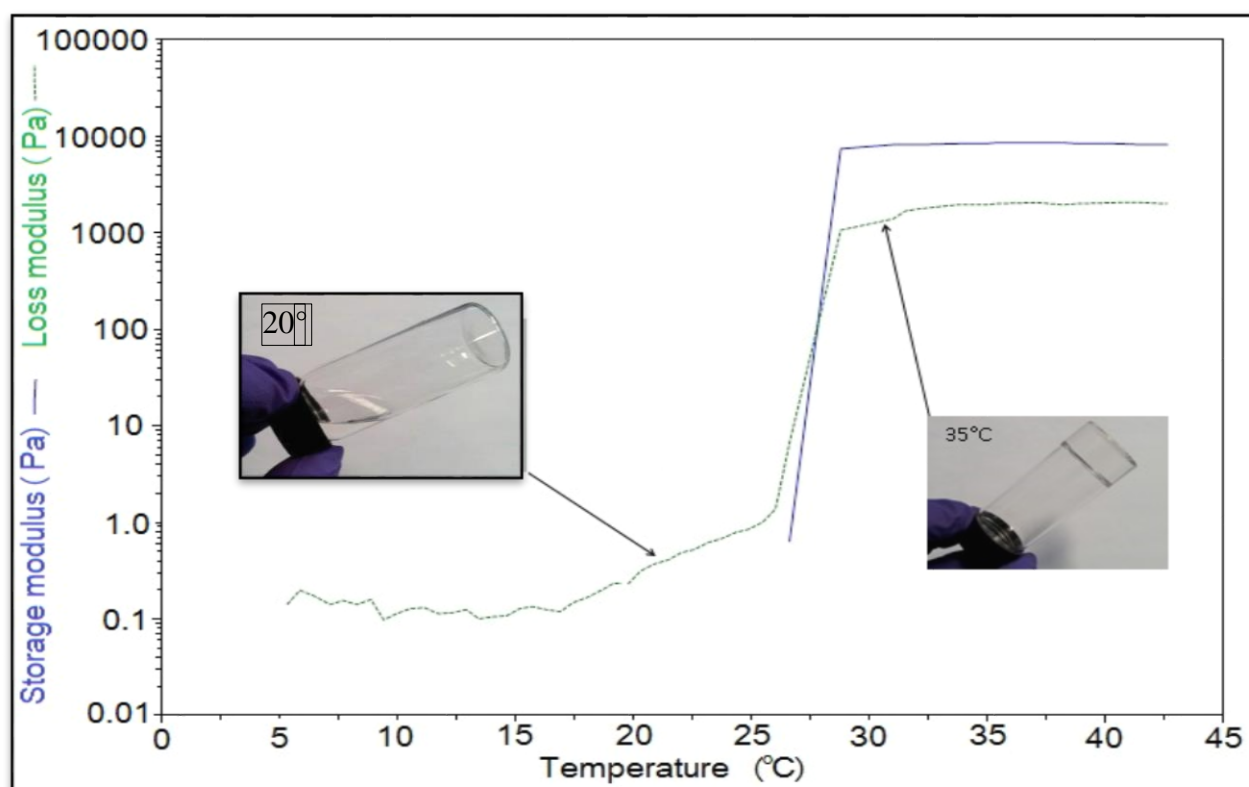


Рисунок 4 - Гелеобразование в 20 % растворах Pluronic F127 при повышении температуры

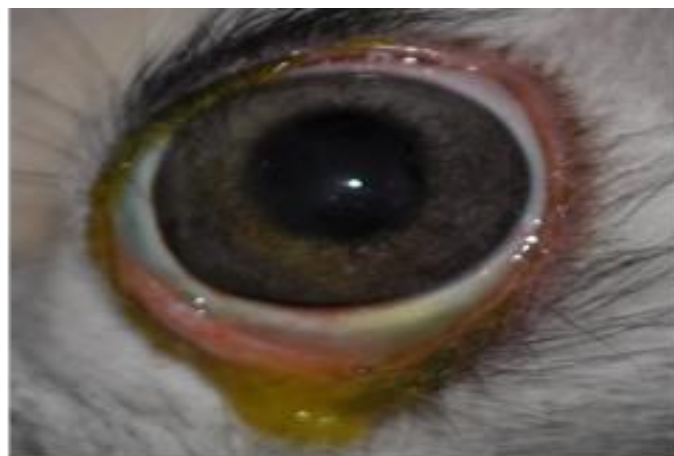
### 3.2 Результаты удерживаемости ГЛП, содержащих рибофлавин и гелеобразующего раствора на основе Pluronic F127 и Pluronic F68

Интенсивная желтая окраска рибофлавина и флюоресцеина, позволяет наблюдать процесс удерживания лекарственных форм, содержащих данные

препараты, непосредственно на поверхности глаз кроликов визуально и при помощи видеокамеры. Рисунок 5 показывает процесс смывания пленки с рибофлавином.



5 мин



40 мин

Рисунок 5 - Фотографии пленки на основе композиции ПАК и МЦ с рибофлавином, на поверхности глаза кролика через 5 и 40 минут с момента наложения

При анализе изображений нами установлено, что время удерживания рибофлавина на поверхности глаза зависит от химического состава пленок, в частности, от соотношения ПАК и МЦ в композициях. Пленки, содержащие избыток МЦ способствовали более длительному удерживанию рибофлавина на поверхности глаза благодаря их сравнительно медленному растворению. Так, например, пленка, состоящая из 100 % МЦ, давала наибольшее время удерживания (около 50 минут); однако, данная композиция не была достаточно адгезивна. Недостаток мукоадгезивных свойств, характерных для 100 % МЦ, приводит к сложностям при наложении пленок на поверхности глаз. На начальных этапах наложения наблюдалось «отлипание», что требовало дополнительных усилий для установления адгезивного контакта с поверхностью роговицы. Пленка с 100 % ПАК напротив была слишком адгезивной и прилипала не только к поверхности роговицы, но и к верхнему веку, создавая значительные трудности проведения таких исследований. Пленка на основе 100 % ПАК растворялась и смывалась с роговицы в течение 10 минут. Наиболее оптимальные результаты были получены при исследовании пленок, содержащих смеси ПАК и МЦ (50:50 %, 30:70 % и 70:30 %); время удерживания пленок на роговице в этом случае достигало 30 – 50 минут. Смешение полимеров в пленках позволяет получить материалы с оптимальными свойствами благодаря хорошей пленкообразующей способности и медленному растворению МЦ, и высокой способности ПАК к мукоадгезии. Зеленый цвет в виде свечения на рисунке 6 показывает удерживание 1 мг/мл

растворов флюоресцеина на глазах кроликов в 20 % растворах Pluronic F127 и Pluronic F68.

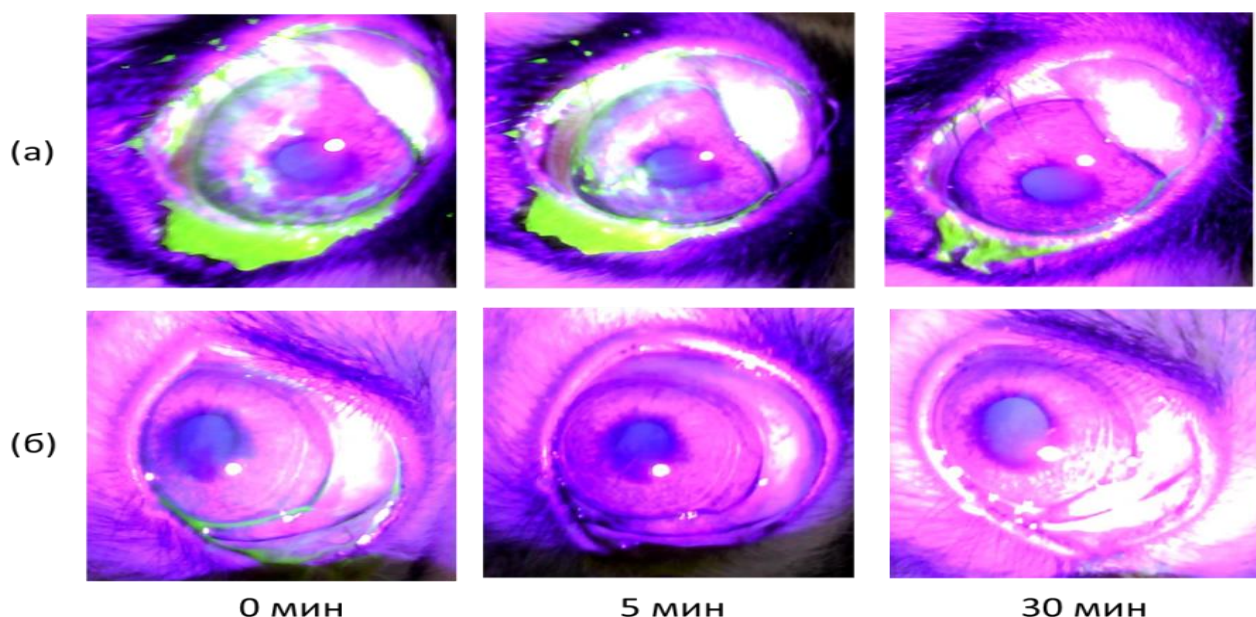


Рисунок 6 - Удерживание 1 мг/мл растворов флюоресцеина натрия в 20 % растворах Pluronic F 127 (a) and 20 % Pluronic F68 (б) на глазу кроликов *in vivo*

Полученные результаты указывают на лучшую удерживаемость флюоресцеина в присутствии гелеобразующего полимера (Pluronic F 127) по сравнению с полимером, который не образует гель (Pluronic F68).

Для количественной оценки характера удерживания флюоресцеина в присутствии Pluronic F127 и Pluronic F68 в ходе экспериментов нами брались образцы слезной жидкости путем легкого касания нижней части глаза предварительно взвешенным ватным тампоном. Средняя масса каждой взятой пробы слезной жидкости в ходе эксперимента составила  $0,076 \pm 0,069$  г. Далее флюоресцеин находящийся в образцах слезной жидкости экстрагировался в этанол, и его содержание анализировалось спектрофотометрически. Рисунок 7 показывает изменение содержания флюоресцеина в слезной жидкости кроликов со временем. Если на начало эксперимента в обеих исследуемых группах содержание было на уровне, не имеющим достоверно значимое отличие, 0,583 мкг для Pluronic F68 и 0,598 мкг для Pluronic F127 ( $p=0,07$ ), то уже через 10 минут эта разница была статистически значима ( $p=0,002$ ). Весь период наблюдения в течении 60 минут производился забор слезной жидкости и спустя 40 минут в группе с применением Pluronic F68 концентрация флюоресцеина была на уровне 0, тогда как во второй группе определялся на 60-ой минуте 0,008 мкг ( $p=0,001$ ). Результаты такого анализа однозначно показывают большую способность Pluronic F127 к формированию геля *in situ* на поверхности глаза кроликов, что способствует лучшему удерживанию флюоресцеина (приблизительно до 40 минут). В случае с Pluronic F68 гель не

образуется и флюоресцеин удерживается на глазу лишь незначительное время (до 15 минут).

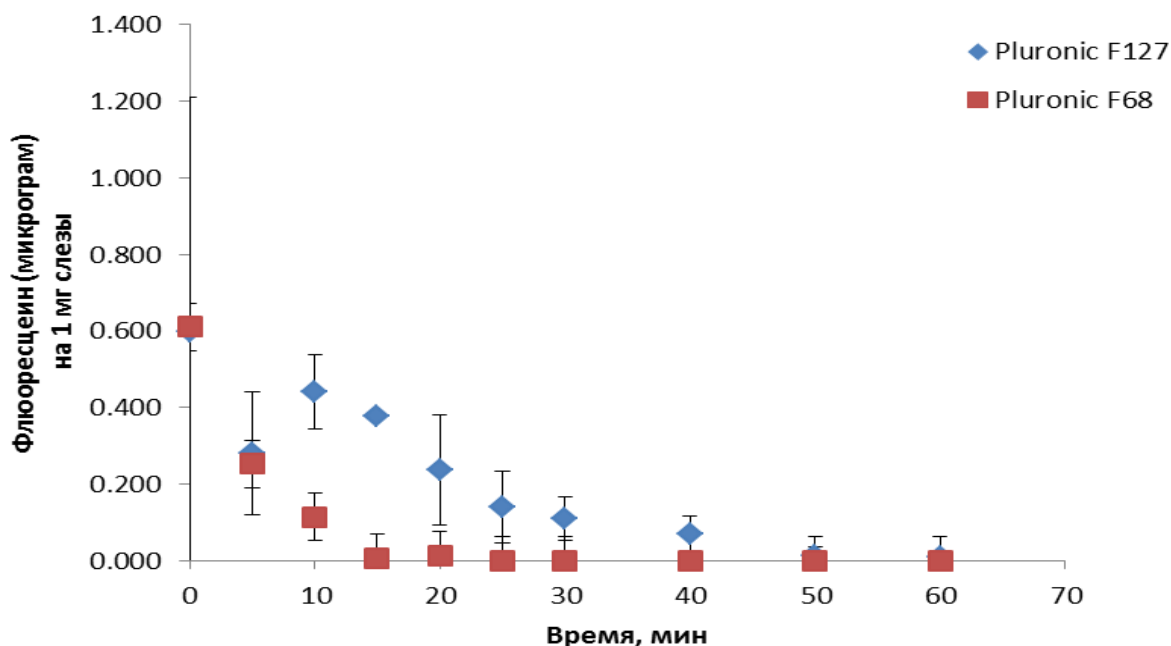


Рисунок 7 - Содержание флюоресцеина в слезной жидкости кроликов в зависимости от времени, прошедшего с момента закапывания капель, содержащих 20 % Pluronic F127 или Pluronic F68

В результате данного этапа работы разработаны методы исследования удерживания глазных пленок и гелеобразующих капель на глазах кроликов в экспериментах *in vivo*. Показано, что химический состав глазных пленок оказывает существенное влияние на характер удерживания. Так, ГЛП на основе ПАК/МЦ в пропорции 30/70% обладает наилучшими мукоадгезивными свойствами и длительным временем экспозиции на поверхности глаза в течении 50 минут. Глазные капли, изготовленные с применением Pluronic F127, проявляют большую способность к удерживанию на глазах (40-50 минут) по сравнению с Pluronic F68 (15 минут), которые не обладают свойством формирования геля.

### 3.3 Результаты изучения переносимости (общей и местной) и влияние на состояние глаза лекарственных пленок, МКЛ и гелеобразующих растворов Pluronic F127, содержащих ЦФ

В ходе изучения местной переносимости ГЛП с ципрофлоксацином, МКЛ и гелеобразующего раствора на основе Pluronic F127 установлено, что ежедневное закладывание в полость конъюнктивы ГЛП, МКЛ и закапывание 70 микролитров гелеобразующего раствора на основе Pluronic F127, в течении всего срока экспериментального исследования, не оказывало внешнего

раздражающего влияния и каких-либо отрицательных изменений со стороны глаз животных опытных групп не наблюдалось.

Ежедневная картина глаз кроликов: кожа век спокойная, конъюктива глазного яблока бледно-розового цвета, гладкая, блестящая, роговица прозрачная. Флюоресцеиновая проба подтверждала целостность переднего эпителия роговицы. Не оказывало токсико-аллергического воздействия на ткани и оболочки глаза подопытных животных.

В результате проведенных экспериментальных исследований установлено, что закладывание глазной пленки с ЦФ, МКЛ и закапывание гелеобразующего раствора на основе Pluronic F127, не оказывало влияния на общее состояние лабораторных животных, характер поведения (агрессивность, вялость), внешний вид, состояние шерстного покрова, слизистых оболочек, аппетит, температуру тела, характер выделений, изменение веса. Наблюдение за весом, температурой тела кроликов отражены в таблицах 11 и 12.

Таблица 11 - Температура тела кроликов в группах, °C

Время измерения	Первая группа, t тела, °C ( $\underline{M \pm o}$ )	Вторая группа, t тела, °C ( $\underline{M \pm o}$ )	Третья группа, t тела, °C ( $\underline{M \pm o}$ )	Четвертая группа, t тела, °C ( $\underline{M \pm o}$ )	Критерий Краскела-Уоллиса, p
До исследования	39,0±0,4	38,9±0,2	38,9±0,1	38,9±0,1	0,09
1-ые сутки	38,8±0,4	38,9±0,1	39,0±0,4	38,8±0,4	
5-е сутки	38,9±0,1	38,8±0,4	38,7±0,5	38,5±0,3	
10-е сутки	39,2±0,3	39,1±0,3	39,0±0,3	39,1±0,2	
15-е сутки	39,0±0,1	39,0±0,2	38,9±0,4	38,4±0,3	
20-е сутки	38,7±0,5	38,7±0,6	38,8±0,4	38,9±0,1	
25-е сутки	39,0±0,2	38,9±0,2	38,9±0,3	38,3±0,5	
30-е сутки	38,9±0,4	38,8±0,3	38,9±0,2	38,6±0,1	

Таблица 12 - Масса тела животных в группах, кг

Время измерения	Первая группа, масса тела, кг ( $\underline{M \pm o}$ )	Вторая группа, масса тела, кг ( $\underline{M \pm o}$ )	Третья группа, масса тела, кг ( $\underline{M \pm o}$ )	Четвертая группа, масса тела, кг ( $\underline{M \pm o}$ )	Критерий Краскела-Уоллиса, p.
1	2	3	4	5	6
До исследования	2,63±0,2	2,61±0,4	2,57±0,4	2,73±0,4	0,07
1-ые сутки	2,67±0,3	2,63±0,3	2,58±0,5	2,77±0,3	
5-е сутки	2,71±0,5	2,70±0,2	2,63±0,1	2,69±0,2	
10-е сутки	2,76±0,4	2,76±0,1	2,70±0,3	2,75±0,5	
15-е сутки	2,80±0,3	2,80±0,3	2,74±0,4	2,81±0,4	
20-е сутки	2,85±0,5	2,86±0,2	2,79±0,6	2,72±0,2	



Продолжение таблицы 12

1	2	3	4	5	6
25-е сутки	2,89±0,2	2,91±0,5	2,87±0,2	2,75±0,1	
30-е сутки	2,95±0,4	2,96±0,2	2,95±0,3	2,89±0,4	

По истечении 30- суток эксперимента глаза животных энуклеировали и исследовали гистологическим методом. Результаты гистологических исследований опытных групп подтвердили отсутствие каких-либо патологических изменений со стороны структур глазного яблока, в том числе сетчатой оболочки. Гистоморфологическая картина глаз кроликов опытных групп оказалась идентична гистологической картине глаз животных контрольной группы.

Срез роговой оболочки свидетельствовал о сохранности всех ее слоев. Поверхность роговицы была ровная, передний эпителий непрерывен на всем протяжении, роговичные пластины располагались параллельными рядами, боуменова и десцеметова оболочки структурированы, задний эпителий полностью сохранен (рис 8).

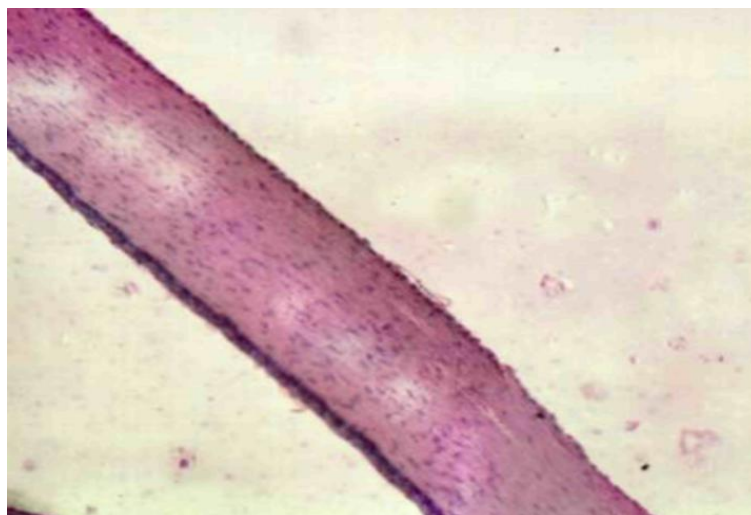


Рисунок 8- Гистологический препарат роговицы глаза кроликов опытных групп. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото. Ув. 100

Патологических изменений со стороны структур склеры, радужки, цилиарного тела не обнаружено (рис 9).

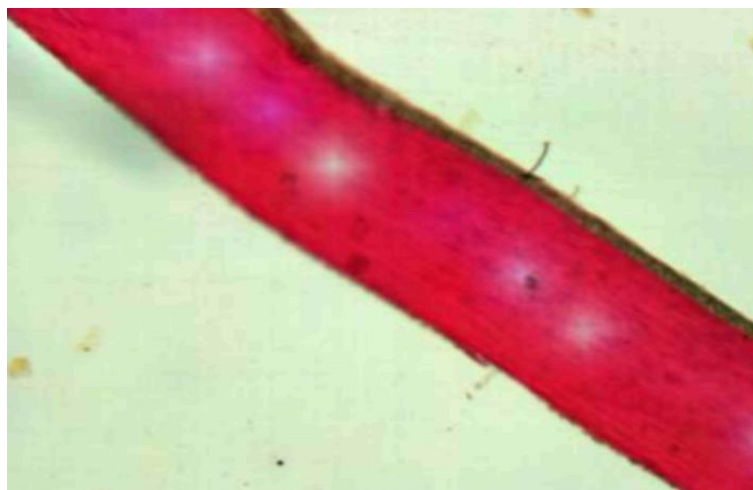


Рисунок 9- Гистологический препарат склеры глаза кроликов опытных групп. Окраска пикрофуксином по Ван Гизону. Микрофото. Ув. 100

Угол передней камеры оставался открытым. В хрусталике, стекловидном теле, хориоидее, сетчатке и зрительном нерве изменений не выявлено (рис 10).



Рисунок 10- Гистологический препарат сетчатки глаза кроликов опытных групп. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото. Ув. 100

Таким образом, отсутствие признаков токсико-аллергического влияния ежедневного закладывания глазных лекарственных пленок, МКЛ с ЦФ и закапывание гелеобразующего раствора на основе Pluronic F127, в течении всего эксперимента (30 дней) на ткани глаза, подтвержденное клинико-экспериментальными наблюдениями, морфологическими исследованиями свидетельствует о хорошей местной переносимости и безопасности разработанных глазных пленок. Гистологическая картина глаз животных контрольной и опытных групп сопоставима. Также необходимо отметить, что при закладывании глазных пленок с ципрофлоксацином, МКЛ с ЦФ и закапывание гелеобразующего раствора на основе Pluronic F127 в течении всего



срока наблюдения как в опытных, так и в контрольной группе не выявлено нарушения характера поведения (агрессивность, вялость), внешнего вида, состояния шерсти, аппетита, температуры тела, характера выделений, изменения веса лабораторных животных.

Разработанные нами глазные пленки с ципрофлоксацином на основе ПАК и МЦ, МКЛ и гелеобразующий раствор на основе Pluronic F127 с ЦФ-ном не оказывают отрицательного влияния на состояние глаз.

### **3.4 Результаты изучения терапевтической эффективности глазных лекарственных форм, содержащих ципрофлоксацин, на модели экспериментального воспаления глаз**

Инстилляция 0,04 % раствора Иннокаина вызвала необходимый фармакологический эффект анестезии для безболезненного нанесения травмы по центру роговой оболочки глаза. После расслоения роговицы левого глаза всех экспериментальных животных, КОЕ в  $10^7$ - $10^8$  степени золотистого стафилококка вызвала в 100% случаев развитие модельной гнойной язвы роговицы для изучения эффективности мукоадгезивных глазных лекарственных форм. Каждая группа животных наблюдалась в течение 10 суток.

Степень выраженности воспалительной реакции в опытных группах с лечением и отсутствием лечения была различной. Так через сутки у всех кроликов в экспериментальной группе без лечения отмечалось гнойное отделяемое, умеренный отек век и выраженная смешанная инъецированность глазного яблока. По центру роговицы сформировался средней интенсивности гнойный инфильтрат желтоватого цвета около 5 мм в диаметре. При закапывании 1 мг/мл раствора флуоресцеина в дистиллированной воде на вторые сутки после нанесения травмы определялся дефект эпителия размером 4-4,5 мм, соответствующий инфильтрату. Вокруг инфильтрата был перифокальный отек, при этом отмечалось появление диффузной инфильтрации стромы окружающих отделов роговицы. Рисунок 11 показывает наличие всех симптомов на протяжении 10 дней в группе без лечения.



1-й день

5-й день

10-й день

Рисунок 11 - Фотографии глаз кроликов, показывающие развитие экспериментальной гнойной язвы (без лечения) на 1-ые, 5-ые, 10-ые сутки после травмы

На 5-е сутки сохранялся умеренный отек век; гнойное отделяемое несколько уменьшалось, при этом сохранялась выраженная смешанная инъектированность сосудов глазного яблока. Интенсивность гнойной инфильтрации роговицы и перифокальная реакция нарастали; диффузная инфильтрация стромы также несколько увеличивалась. В 90 % животных с наиболее тяжелым процессом в отдельных секторах появилась смешанная васкуляризация роговицы, протяженностью до 2-2,5 мм от лимба. И лишь у одного кролика (10 %) отмечалось начало эпителизации роговицы, но новообразованный эпителий был нестойким и легко повреждался при любых манипуляциях. В пределах радужной оболочки формировалась фибринозно-гнойная пленка, при этом зрачок был узким и не реагировал на свет.

На 10-е сутки веки были почти спокойны; сохранялось небольшие гнойные выделения, а также отмечалась умеренная смешанная инъектированность сосудов склеры. Инфильтрат уменьшался по площади и интенсивности. У одного кролика (10%) отмечалась полная эпителизация роговицы, но эпителий был неравномерным, бугристым и шероховатым. Перифокального отека роговицы практически не было, но интенсивность ее васкуляризации сохранялась прежней, и сосуды доходили до центра роговицы.

При анализе всех данных в экспериментальной группе кроликов без лечения в 90 % случаев развился язвенный дефект роговицы, разный по площади и глубине. Лишь в одном случае появлялись признаки эпителизации, но в стадию изъязвления инфильтрат не перешел. Также у одного кролика на 6-7 сутки наблюдался процесс формирования рубцового помутнения роговицы.

Экспериментальная группа с лечением каплями ципрофлоксацина имела картину, отличную от той, в которой антибиотик не использовался. Так, несмотря на своевременно начатое лечение, в течении 12-24 часов после нанесения травмы было зафиксировано развитие гнойной язвы. Из рисунка 12 видны все признаки стадии инфильтрации.



1-й день

5-й день

10-й день

Рисунок 12 - Фотографии глаз кроликов, показывающие развитие экспериментальной гнойной язвы (с лечением антибиотиком) на 1-ые, 5-ые, 10-е сутки после травмы

При монотерапии ципрофлоксацином с первых суток патологии в течении 12-24 часов также было отмечено развитие гнойной язвы с различной степенью

гнойного отделяемого у 90% подопытных животных. По сравнению с группой, где лечение антибиотиком не проводилось, уровень отека век был умеренным и нарастание выделений наблюдалось в 70% случаев. На 5-е сутки интенсивность инфильтрации и смешанная инъецированность сосудов глазного яблока также имели место у 80 % животных. Гнойное отделяемое уменьшилось у 3 кроликов (30 %). Смешанная васкуляризация роговицы до 1,5-2,0 мм от лимба с тяжелым процессом была отмечена лишь у 1-го кролика, зрачок которого не реагировал на свет. На 10-е сутки наблюдения экспериментальной группы с лечением гнойное отделяемое было зафиксировано у 40 %, при этом отмечалась легкая смешанная инъецированность сосудов глазного яблока. Инфильтрат уменьшился в размерах у 60 % кроликов.

Клиническая картина в подопытной группе, где проводилось лечение гелеобразующим раствором на основе Pluronic F127, содержащим 0,3 ципрофлоксацина имела отличную от группы патологии. В течение суток после нанесения травмы в 100 % случаев развился гнойный кератит. По сравнению с группами, где лечения не было и с группой, в которой лечение при помощи капель Ципролет, уровень слезотечения, отека и гнойного отделяемого был менее умеренным, и нарастание отделяемого наблюдалось в 45% случаев. На 5-сутки наблюдения смешанная инъецированность сохранялась у 50% кроликов. Гнойное отделяемое уменьшилось у 45% кроликов. Через 10 дней от начала лечения гнойного отделяемого не наблюдалось, т.е. был купирован этот симптом. Инфильтрация у 20% животных все же сохранялась, и образовалось бельмо на роговице соответственно.

Гнойное отделяемое и гиперемия наблюдалась у всех кроликов группы животных, которых лечили МКЛ, пропитанными ЦФ. Нарастание отделяемого в 50 % случаев в данной группе проходило в течение первых 5-ти дней. Но нужно отметить также и развитие в 100% случаев экспериментальной язвы. Все симптомы воспаления в виде отека, гноя, гиперемии и слезотечения начали регрессировать через 6-7 дней от начала лечения. Инфильтрация сохранилась в 25% случаев в данной группе. После окончания лечения у 20% животных присутствовало воспаление в виде незначительной гиперемии и бельмо по центру роговицы.

Независимо от типа лечения в экспериментальных группах через 1 сутки после нанесения травмы в 100% случаев было развито воспаление с гнойным отделяемым. Такая же картина соответствовала в группе кроликов, которых лечили ГЛП на основе ПАК/МЦ, но с различной степенью гноя, отека и гиперемии. Так у 80% животных нарастание клиники было отмечено впервые 4-5 дней течения язвенного кератита. Гнойное отделяемое, сопровождалось слезотечением только впервые 3 дня болезни. Далее на 5-е сутки от начала лечения заметно снизилось гнойное отделяемое у 55% кроликов данной группы. 10-е сутки сопровождалось наличием отека перифокального у 35% кроликов и краевой гиперемии в 30% случаев.

ГЛП на основе ПВП при однократном применении дают следующие клинические показатели гнойного воспаления роговицы: у 55% животных

нарастание гиперемии параллельно с гнойным отделяемым мы наблюдали в течении 6 дней. Но язва развивалась в 100% случаев. Слезотечения было меньше, по сравнению с остальными группами. Но в течении первых 2-х дней гнойное отделяемое сопровождалось слезотечением у 80%, что привело к слипанию века соответственно. На 5- сутки уменьшение гиперемии зафиксировано у 50%, на 10 сутки снижение наблюдалось у 80% подопытных животных.

Таким образом, степень выраженности воспалительной реакции глаз напрямую зависит от применяемой глазной лекарственной формы. В группе без лечения в 100% случаев сформировался дефект роговицы в виде бельма, и стандартное лечение не предотвратил развития этого осложнения. ГЛП на основе ПВП и ПАК/МЦ лишь на 50-60 % показали эффективность соответственно. Обладателем наилучшего результата течения язвы без осложнений в 80% случаев были животные, которые получали лечение ципрофлоксацином на основе Pluronic F127.

Целью данного этапа работы, проведенного в период с 2015-2017 гг, с изучением роговицы 70 кроликов обоего пола с экспериментальной гнойной язвой роговицы и без нее, являлось изучение показателей температуры тела, бактериологического посева стафилококка, объективных показателей клинической картины [179]. На данном этапе доля животных мужского пола составила 52,85% (n=37), женского пола 47,14% (n=33). Как видно из рисунка 13 обе группы по разделению пола в группах репрезентативны.

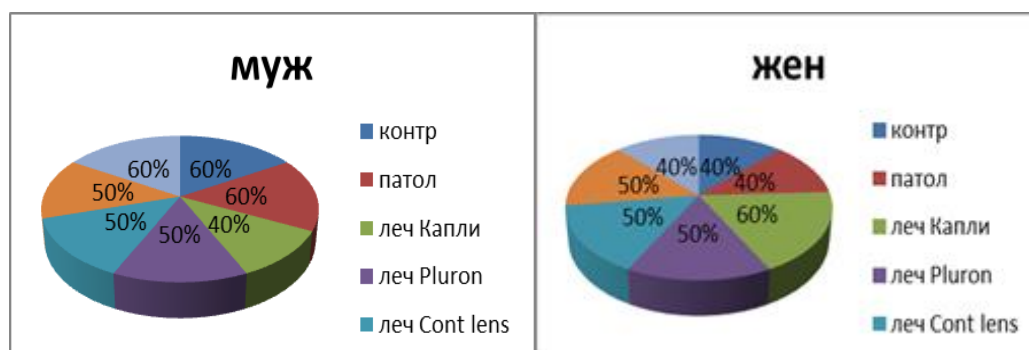


Рисунок 13 - Распределение пола кроликов по группам

При сравнении (таблица 13), средний вес кроликов во 2-ой группе с патологией язвы роговицы и без лечения был наименьшим ( $M_e=2975,0$ ), тогда как в 7-ой группе с патологией и лечением ГЛП на основе ПВП, содержащим ЦФ, был наибольшим ( $M_E=3165,0$ ) [180]. Полученный результат стал предпосылкой для дальнейшего изучения в данных группах изменений температуры тела, бактериологического посева из глаз на золотистый стафилококк (КОЕ), клинических показателей: слезотечения, гиперемии, гнойного отделяемого, отека конъюнктивы.

Таблица 13 - Показатели веса кроликов

Наименование Группы	МЕ	ДИ	Критерий Краскела-Уоллиса, р
Контроль	3000,0	2951,783 3114,217	0,845
Патология без лечения	2975,0	2931,940 3066,060	
Лечение «Ципролет»	3025,0	2728,196 3117,804	
Лечение Pluronic ЦФ	3075,0	2949,794 3148,206	
Лечение МКЛ с ЦФ	3000,0	2968,865 3123,135	
Лечение ГЛП (ПАК/МЦ)	3150,0	3027,342 3204,658	
Лечение ГЛП (ПВП)	3165,0	3069,954 3302,046	

Показатель веса является более нестабильной переменной, изменяющейся в течении всего периода жизни животных. В целом распределение признака имело отличное от нормального, вследствие чего при расчете средних показателей мы использовали показатель медианы Ме и межквартильные интервалы [181]. Как видно из таблицы 14, средний вес кроликов в 7 различных группах в зависимости от пола не отличается.

Таблица 14 - Средние показатели веса кроликов в зависимости от пола в группах

Критерий	Ме	SD	Процентили		Сред ранг	Хи-квад	Ст. св	р
			25	75				
Вес	3057,0	142,96	2950,0	3050,0	36-жен 35,05-муж	0,038	1	0,845

Полный набор экспериментального материала был окончен в 2017 году. Количество кроликов во всех группах было равным 10, продолжительность наблюдений одинаковое, в течении 10 дней. В течение всего эксперимента каждому кролику в каждой группе применялись различные ГЛФ согласно схеме. Однократное применение ГЛФ было у 40 кроликов, что соответствует 57,14%, 4-кратное применение у 30 кроликов, соответственно 42,85% случаев.

Сравнение показателей температуры тела в этом этапе исследования показали следующие различия. Так на 0 день, сразу после нанесения травмы, с последующим занесением стафилококка, наименьшая температура тела была в

3 группе ( $M_e=38,80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), где лечение было каплями Ципролет, производства Доктор Редди'с и наибольшая в контрольной группе ( $M_e=39,30^{\circ}\text{C}$ ).

Как видно из таблицы 15, средняя температура тела кроликов через сутки после нанесения травмы имела разницу. Средний показатель температуры тела кроликов в 4-ой группе на 0,200 ( $M_e=39,30^{\circ}\text{C}$ ) больше, чем в 3-ей группе ( $M_e=39,10^{\circ}\text{C}$ ) и на 0,650 ниже, чем в 5-ой ( $M_e=39,75^{\circ}\text{C}$ ) и 6-ой группах ( $M_e=39,75^{\circ}\text{C}$ ), что имеет статистическую значимость ( $p=0,003$ ). В других группах различия в температурных данных не имели статистической значимости.

Таблица 15 - Показатели температуры тела кроликов (1, 2 дни - через сутки после нанесения травмы)

Дни	Наименование группы	ME	ДИ	Критерий Краскела-Уоллиса
1	Контроль	39,300	38,744 39,516	$p=0,06$
	Патология без лечения	39,150	38,558 39,622	
	Лечение «Ципролет»	39,100	38,757 39,423	
	Лечение Pluronic ЦФ	39,300	39,187 39,653	
	Лечение МКЛ с ЦФ	39,750	39,462 39,938	
	Лечение ГЛП (ПАК/МЦ)	39,750	39,457 39,863	
	Лечение ГЛП (ПВП)	39,700	39,519 39,841	
2	Контроль	39,550	39,037 39,783	$p=0,08$
	Патология без лечения	39,300	38,651 39,849	
	Лечение «Ципролет»	39,550	39,364 39,716	
	Лечение Pluronic ЦФ	39,850	39,617 40,043	
	Лечение МКЛ с ЦФ	39,900	39,731 40,189	
	Лечение ГЛП (ПАК/МЦ)	39,900	39,818 40,082	
	Лечение ГЛП (ПВП)	39,900	39,818 40,002	

На 2-ые сутки наблюдения средний показатель температуры подлежал нормальному распределению и имел статистическую значимость различий

только в 7-ой группе (Me=39,900) при  $p=0,002$ , о чем свидетельствует показатель средней температуры (таблица 15).

В течение 3-го и 4-го дня значимых отличий не наблюдалось. Средняя температура на 5-ые сутки наблюдения имела статистически значимые различия во 2-ой группе (Me=40,000)  $p=0,001$ , что 0,150 меньше максимальной в 7-ой группе (Me=40,150) и на 0,400 больше минимальной температуры в 4-ой группе (Me=39,600). Полученные результаты (таблица 16) показывают о нарастании температуры тела во 2-ой группе на 5-ые сутки, что объясняется гнойно-воспалительным процессом без лечения. В 4-ой группе животных, которые получают лечение гелеобразующим раствором, содержащим ЦФ, идет положительная динамика в лечении, что возможно объясняется более длительным удерживанием на поверхности глаза и большим проникновением ЦФ в роговицу. Тогда как в 7-ой группе, получавших лечение ГЛП на основе ПВП, содержащими также ЦФ, температура возрастает относительно 0-го дня.

Таблица 16 - Показатели температуры тела кроликов (5, 6 дни - после нанесения травмы)

Дни	Наименование группы	МЕ	ДИ	Критерий Краскела-Уолиса, p
5	Контроль	39,760	39,323/ 40,197	=0,003
	Патология без лечения	39,500	38,868 40,132	
	Лечение «Ципролет»	39,300	39,147 39,373	
	Лечение Pluronic ЦФ	39,600	39,359 39,681	
	Лечение МКЛ с ЦФ	39,900	39,678 40,002	
	Лечение ГЛП (ПАК/МЦ)	40,050	39,943 40,137	
6	Контроль	МЕ	ДИ	=0,002
	Патология без лечения	39,700	39,268 40,132	
	Лечение «Ципромед»	39,900	38,933 40,007	
	Лечение Pluronic ЦФ	39,100	38,958 39,162	
	Лечение МКЛ с ЦФ	39,400	39,209 39,551	
	Лечение ГЛП (ПАК/МЦ)	39,800	39,545 39,895	
	Лечение ГЛП (ПВП)	39,850	39,709 39,971	



Предположение о большем проникновении антибиотика, вызывающего положительную динамику, в роговицу при использовании гелеобразующего раствора содержащего ЦФ (таблица 16), подтверждают данные среднего значения температуры на 6-ые сутки эксперимента, который имеет статистически значимую разницу ( $Me=39,400$ ). Во второй и седьмой группах ( $Me=39,900$  и  $Me=40,000$ )  $p=0,003$ .

В последующие 3 дня данные температуры снижались каждые сутки. Так на 7-ой день существенная разница наблюдалась в группе с лечением ГЛП на основе ПВП, содержащего ЦФ ( $Me=39,900$ ,  $p=0,001$ ). 8-ые сутки эксперимента без статистически значимой разницы. На 9 день во второй группе  $p=0,003$  при  $Me=39,500$ , в других группах  $p$  было  $=0,06$ .

На конец эксперимента во всех группах наблюдается статистически значимые отличия температурных показателей (таблица 17). Спустя 10 дней 1 группа контроля, имела разницу на 0,100 ( $Me=39,400$ ), что было значимо, по сравнению с группами 2,4,5,6,7. В 3-ей группе снижение температуры также значимо с разницей в 0,200 ( $Me=38,600$ ).

Таблица 17 - Показатели температуры тела кроликов (10 день - после нанесения травмы)

Наименование группы	МЕ	ДИ	Критерий Краскела-Уолиса, p
Контроль	39,400	38,945 39,695	p=0,001
Патология без лечения	39,100	38,651 39,469	
Лечение «Ципролет»	38,600	38,564 38,676	
Лечение Pluronic ЦФ	38,650	38,431 38,869	
Лечение МКЛ с ЦФ	39,400	39,049 39,491	
Лечение ГЛП (ПАК/МЦ)	39,250	38,974 39,426	
Лечение ГЛП (ПВП)	39,200	39,010 39,370	

Резюмируя данный этап статистического анализа, мы можем предположить, что температурные данные являются достоверно значимыми показателями и могут служить в качестве критерия оценки эффективности лечения различными глазными лекарственными формами в следующих исследованиях. Мы провели сравнительный анализ показателей температуры в зависимости от групп исследования. Учитывая нормальное распределение данных, сравнительный анализ был проведен с применением дисперсионного анализа ANOVA, который показал, что различия в группах температурных данных, в зависимости от типа лечения, статистически значимы (таблица 18). При этом во всех группах температурных показателей на 0 день, равенства



дисперсий не наблюдалось, вследствие чего, проведены робастные тесты на равенство средних с применением критериев Уэлча и Брауна-Форсайта.

Таблица 18 - ANOVA- показатели температуры 0 день

Группа	n	Сре днее	SD	Станд ошиб ка	95% ДИ	
					Нижняя граница	Верхняя граница
1	2	3	4	5	6	7
Конт роль	10	39,1 30	0,5397	0,170 7	38,744	39,516
Патоло гия	10	38,8 00	0,3682	0,116 4	38,537	39,063
Лечение Ципро лет	10	38,6 40	0,4033	0,127 5	38,351	38,929
Лечение Pluronic	10	38,8 90	0,2881	0,091 2	38,684	39,096
МКЛ	10	39,1 9	0,4886	0,154 5	38,840	39,540
Лечение ПАК/МЦ	10	39,0 9	0,3281	0,103 8	38,855	39,325
Лечение ПВП	10	39,0 10	0,3315	0,104 8	38,773	39,247
Итог	70	38,9 64	0,4256	0,050 9	38,863	39,247
Критерий однородности дисперсий						
Критерий	Сумма квадра тов	Степени свободы	Средний квадрат	F	p	
Между группами	2,340	6	0,390	2,418	0,0003	
Внутри групп	10,161	63	0,161			
Апостериорное сравнение средних значений температуры на 0 день						
Группа (I)	Сравн ивае мые Груп пы (J)	Разно сть Сред них (I-J)	Стандар тная ошибка	P	95% Доверит интер	
					Ниж гран	Верх гран
1.Конт роль	Патол огия	0,3300*	0,2302	1,000	-0,822	0,702
	Капл и	0,4900*	0,2130	0,300	-0,220	1,200
	Plugo nic	0,2400*	0,1935	0,867	-0,422	0,902
2.Пато логия	Контр оль	-0,3300*	0,2066	0,686	-1,023	0,363
	Plugo nic	-0,0900*	0,1479	0,996	-0,582	0,482

Продолжение таблицы 18

1	2	3	4	5	6	7
	Леч МКЛ	-0,3900*	0,1935	0,441	-1,035	0,255
	ПАК/ МЦ	-0,2900*	0,1560	0,529	-0,806	0,226
	ГЛП ПВП	-0,2100*	0,1567	0,824	-0,728	0,308
3. Лечение каплями	Контр оль	-0,4900*	0,2130	0,300	-1,200	0,220
	Патол огия	-0,1600*	0,1727	0,963	-0,731	0,411
	Pluro nic	-0,2500*	0,1568	0,688	-0,774	0,274
	Леч МКЛ	-0,5500*	0,2004	0,145	-1,215	0,115
	ГЛП ПАК/ МЦ	-0,4500*	0,1644	0,147	-0,996	0,096
	ГЛП ПВП	-0,3700*	0,1651	0,324	-0,918	0,178
4.Pluronic	Контр оль	-0,2400*	0,1935	0,867	-0,902	0,422
	Леч МКЛ	-0,3000*	0,1794	0,643	-0,909	0,309
	ГЛП ПАК/ МЦ	-0,2000*	0,1382	0,770	-0,657	0,257
	ГЛП ПВП	-0,1200*	0,1390	0,974	-0,580	0,340
5.ГЛП РАА\МС	Контр оль	-0,4000*	0,1997	1,000	-0,716	0,636
	Леч МКЛ	-0,1000*	0,1867	0,998	-0,725	0,525
6.ГЛП РVP	Контр оль	-0,1200*	0,2003	0,996	-0,798	0,558
	Леч МКЛ	-0,1800*	0,1867	0,955	-0,807	0,447
	ГЛП ПАК/ МЦ	-0,0800*	0,1475	0,998	-0,567	0,407
*Разность средних значима на уровне 0,0007						

Апостериорное сравнение средних было проведено при помощи критерия Геймса-Хоуэла [181]. При этом средняя температура кроликов на 0 день в группах: контроля, патологии, лечение каплями «Ципролет», гелеобразующим раствором, ГЛП на основе ПАК/МЦ, ГЛП на основе ПВП имела отличия от 5-ой группы, в которой лечение было путем применения МКЛ, пропитанных ЦФ-

ном. Учитывая наличие 7 сравниваемых групп, критический уровень значимости был задан с поправкой Бонферони на уровне 0,0007 (таблица 19).

Средние показатели температуры кроликов на 1 день также имеют достоверно значимые отличия в исследовательских группах ( $p=0,0006$ ). Данные ANOVA представлены в таблице 19. При этом во всех группах соблюдено равенство дисперсий, соответственно были использованы стандартные критерии ANOVA.

Таблица 19 – ANOVA- показатели температуры 1 день

Группа	n	Сред нее	SD	Станд ошибка	95% ДИ	
					Нижняя граница	Верхняя граница
1	2	3	4	5	6	7
Конт роль	10	39,13	0,5397	0,1707	38,744	39,516
Патол	10	39,09	0,7430	0,2350	38,558	39,622
Лечение Ципролет	10	39,09	0,4654	0,1472	38,757	39,423
Лечение Pluronic	10	39,42	0,3259	0,1031	39,187	39,653
Лечение МКЛ с ЦФ	10	39,70	0,3333	0,1054	39,462	39,938
Лечение ПАК\ МЦ	10	39,66	0,2836	0,0897	39,457	39,863
Лечение ПВП	10	39,68	0,2251	0,0712	39,519	39,841
Итог	70	39,39 6	0,5063	0,0605	39,275	39,516
Критерий однородности дисперсий						
Критери й	Сумма квадратов		Степени свободы	Средний квадрат	F	p
Между группам и	5,014		6	0,836	4,153	0,0006
Внутри групп	12,675		63	0,201		
Апостериорное сравнение средних значений температуры на 0 день						
Группа (I)	Сравн иваем ые Групп ы (J)	Разно сть Сред них (I-J)	Станда ртная ошибк а	P	95% Доверит интер	
					Ниж гран	Верх гран
1.Конт роль	Патол огия	0,0400	0,2904	1,0000	-0,930	1.010
	Капл и	0,0400	0,2253	1.0000	-0,706	0,785

Продолжение таблицы 19

1	2	3	4	5	6	7
	Pluronic	-0,2900	0,1994	0,7650	-0,965	0,385
	Леч МКЛ	-0,5700	0,2006	0,1300	-1,248	0,108
	ГЛП ПАК/МЦ	-0,5300	0,1928	0,1580	-1,191	0,131
	ГЛП ПВП	-0,5500	0,1849	0,1170	-1,197	0,097
2.Патология	Контроль	-0,0400	0,2904	1,0000	-1,010	0,930
	Капли	0,0000	0,2772	1,0000	-0,936	0,936
	Pluronic	-0,3300	0,2566	0,8460	-1,224	0,564
	Леч МКЛ	-0,6100	0,2575	0,2870	-1,505	0,285
	ГЛП ПАК/МЦ	-0,5700	0,2515	0,3340	-0,145	0,316
	ГЛП ПВП	-0,5900	0,2455	0,2840	-0,146	0,289
3.Лечение Ципромед	Контроль	-0,0400	0,2253	1,0000	-0,786	0,706
	Патология	-0,0000	0,2772	1,0000	-0,936	0,936
	Pluronic	-0,3300	0,1797	0,5440	-0,932	0,272
	Леч МКЛ	-0,6100	0,1810	0,0007	-1,215	-0,005
	ГЛП ПАК/МЦ	-0,5700	0,1723	0,0580	-1,153	0,013
	ГЛП ПВП	-0,5900	0,1635	0,0007	-1,155	0,025
4.Pluronic	Контроль	0,2900	0,1994	0,7650	-0,385	0,965
	Патология	0,3300	0,2566	0,8460	-0,564	1,224
	Капли	0,3300	0,1797	0,5440	-0,272	0,932
	Леч МКЛ	-0,2800	0,1474	0,5050	-0,767	0,207
	ГЛП ПАК/МЦ	-0,2400	0,1366	0,5910	-0,692	0,212
	ГЛП ПВП	-0,2600	0,1253	0,4100	-0,680	0,160
5.МКЛ	Контроль	0,5700	0,2006	0,1300	-0,108	1,248
	Патология	0,6100	0,2575	0,2870	-0,285	1,505
	Капли	0,6100 *	0,1810	0,0007	0,005	1,215
	Pluronic	0,2800	0,1474	0,5050	-0,207	0,767
	ГЛП ПАК/МЦ	-0,0400	0,1384	1,0000	-,0419	0,499
	ГЛП ПВП	-0,0200	0,1145	1,0000	-0,407	0,447
6.ГЛП ПАК/ МЦ	Контроль	0,5300	0,1928	0,1580	-0,131	1,191
	Патология	0,5700	0,2515	0,3340	-0,316	1,456
	Капли	0,5700	0,1723	0,0580	-0,013	1,153
	Pluronic	0,2400	0,1366	0,5910	-0,212	0,692
	Леч МКЛ	-0,0400	0,1384	1,0000	-0,499	0,419
	ГЛП ПВП	-0,0200	0,1145	1,0000	-0,401	0,361
7.ГЛП ПВП	Контроль	0,5500	0,1849	0,1170	-0,097	1,197
	Патология	0,5900	0,2455	0,2840	-0,289	1,469

Продолжение таблицы 19

1	2	3	4	5	6	7
	Капли	0,590*	0,1635	0,0007	0,025	1,155
	Pluronic	0,2600	0,1253	0,4100	-0,160	0,680
	Леч МКЛ	-0,0200	0,1272	1,0000	-0,447	0,407
	ГЛП ПАК/МЦ	0,0200	0,1145	1,0000	-0,361	0,401
*Разность средних значима на уровне 0,0007						

Сравнение средних показателей температуры на 1 день (таблица 19) эксперимента в 5 группе, где экспериментальную язву лечили МКЛ, пропитанными ЦФ-ном имели статистически значимую разницу с группой, где лечение было стандартными каплями Ципролет (средняя разность= - 0,6100 ( $p=0,0007$ )). И группа с ГЛП на основе ПВП также имела разницу температурных данных с 3-ей группой при  $p=0,0007$  на уровне средней разности= 0,5700. Эти данные свидетельствуют о том, что эффективность лечения была зафиксирована с 1 дня лечения ГЛП, содержащими ЦФ на основе ПАК/МЦ и ПВП.

Дальнейшее исследование температурных данных показало, что на 3 день существенно значимая разница в температуре также имело место (таблица 20). Статистика Ливиня 3-го дня равна 13,637 при  $p=0,0000$ , равенство дисперсий присутствует.

Таблица 20 – ANOVA 3 день

Группа	n	Me	SD	Станд ошибка	95% ДИ	
					Ниж гр	Верх гр
1	2	3	4	5	6	7
Контроль	10	39,570	0,5355	0,1693	39,187	39,953
Патологи я	10	39,450	0,9360	0,2960	38,780	40,120
Лечение Ципро лет	10	39,660	0,1897	0,0600	39,524	39,796
Лечение Pluronic	10	39,790	0,2234	0,0706	39,630	39,950
Лечение МКЛ с ЦФ	10	40,070	0,1889	0,0597	39,935	40,205
Лечение ПАК/МЦ	10	40,100	0,1886	0,0596	39,965	40,235
Лечение ПВП	10	40,120	0,1687	0,0533	39,999	40,241
Итог	70	39,823	0,4920	0,0588	39,706	39,940
Критерий однородности дисперсий						
Критерий	Сумма квадратов	Степени свободы	Средний квадрат	F	p	

Продолжение таблицы 20

1		2	3	4		5	6
Между группами		4,567	6	0,761		3,952	0,0000
Внутри групп		12,136	63	0,193			
Группа (I)	Сравниваемые Группы (J)	Разность Средних (I-J)	Стандарт ошибка	P	95% Доверит интер		
					Ниж гран	Верх гран	
1.Контроль	Патология	0,1200	0,3410	1,000	-1,041	1,281	
	Капли	-0,0900	0,1797	0,998	-0,726	0,546	
	Pluronic	-0,2200	0,1835	0,882	-0,862	0,422	
	Леч МКЛ	-0,5000	0,1796	0,163	-1,136	0,136	
	ГЛП ПАК/МЦ	-0,5300	0,1795	0,126	-1,166	0,106	
	ГЛП ПВП	-0,5500	0,1775	0,104	-1,184	0,084	
2.Патология	Контроль	-0,1200	0,3410	1,000	-1,281	1,041	
	Капли	-0,2100	0,3020	0,990	-1,310	0,890	
	Pluronic	-0,3400	0,3043	0,909	-1,442	0,762	
	Леч МКЛ	-0,6200	0,3020	0,443	-1,720	0,480	
	ГЛП ПАК/МЦ	-0,6500	0,3019	0,395	-1,750	0,450	
	ГЛП ПВП	-0,6700	0,3008	0,362	-1,770	0,430	
3.Ципролет	Контроль	0,0900	0,1797	0,998	-0,546	0,726	
	Патология	0,2100	0,3020	0,990	-0,890	1,310	
	Pluronic	-0,1300	0,0927	0,793	-0,437	0,177	
	Леч МКЛ	-0,4100*	0,0847	0,0002	-0,690	-0,130	
	ГЛП ПАК/МЦ	-0,4400*	0,0846	0,0001	-0,720	-0,160	
	ГЛП ПВП	-0,4600*	0,0803	0,0000	-0,726	-0,194	
4.Pluronic	Контроль	0,2200	0,1835	0,882	-0,422	0,862	
	Патология	0,3400	0,3043	0,909	-0,762	1,442	
	Капли	0,1300	0,0927	0,793	-0,177	0,437	
	Леч МКЛ	-0,2800	0,0925	0,087	-0,587	0,027	
	ГЛП ПАК/МЦ	-0,3100*	0,0924	0,0004	-0,616	-0,004	
	ГЛП ПВП	-0,3300*	0,0885	0,0002	-0,625	-0,035	
5.МКЛ	Контроль	0,5000	0,1796	0,163	-0,136	1,136	
	Патология	0,6200	0,3020	0,443	-0,480	1,720	
	Капли	0,4100*	0,0847	0,0002	0,130	0,690	
	Pluronic	0,2800	0,0925	0,087	-0,027	0,587	
	ГЛП ПАК/МЦ	-0,0300	0,0844	1,000	-,0309	0,249	
	ГЛП ПВП	-0,0500	0,0800	0,995	-0,315	0,215	
6.ГЛПАК/МЦ	Контроль	0,5300	1,795	0,126	-0,106	1,166	
	Патология	0,6500	0,3019	0,395	-0,450	1,750	
	Капли	0,4400*	0,0846	0,0001	0,160	0,720	
	Pluronic	0,3100*	0,0924	0,0004	0,004	0,616	
	Леч МКЛ	-0,0300	0,0844	1,000	-0,249	0,309	
	ГЛП ПВП	-0,0200	0,0800	1,000	-0,285	0,245	

Продолжение таблицы 20

1	2	3	4	5	6	7
7 ГЛП ПВ П	Контроль	0,5500	0,1775	0,104	-0,084	1,184
	Патология	0,6700	0,3008	0,362	-0,430	1,770
	Капли	0,4600*	0,0803	0,0000	0,194	0,726
	Pluronic	0,3300*	0,0885	0,0002	0,035	0,625
	Леч МКЛ	0,0500	0,0801	0,995	-0,215	0,315
	ГЛП ПАК/МЦ	0,0200	0,0800	1,000	-0,245	0,285
*Разность средних значима на уровне 0,0007						

Апостериорное исследование средней температуры на 3-ий день (таблица 20) показывает значимую разницу в одинаковых группах, как и во 2-ой день наблюдения, 3-ья группа отличается от 5-ой группы со средней разностью - 0,4100 ( $p=0,0002$ ), в 6-ой группе эта разность составляет -0,4400 ( $p=0,0001$ ) и при лечении ГЛП на основе ПВП разность -0,4600 ( $p=0,0000$ ). Группа с лечением гелеобразующим раствором Pluronic F127, содержащим ЦФ, на уровне  $p=0,0004$  при средней разности -0,3100 достоверно отличается от групп ГЛП на основе ПАК/МЦ и от ГЛП на основе ПВП средняя разность составила - 0,3300 ( $p=0,0002$ ). На основании вышеизложенного, можно сделать первые выводы, что статистически значимая разница в лечении различными ГЛФ экспериментальной гнойной язвы роговицы ЦФ-ном наблюдается в следующей закономерности: группа стандартного лечения каплями Ципролет отличается от групп МКЛ, ГЛП на основе ПАК/МЦ и ПВП, тогда как группа Pluronic F127 имела зависимость только от ГЛП на основе ПАК/МЦ и ПВП.

Анализ данных 5 и 6-го дней показал, что лечение гелеобразующим раствором на основе полимера Pluronic F127 эффективнее, чем лечение 2 видами ГЛП-ок на основе ПАК/МЦ (средняя разность = - 0,5200 при  $p=0,0000$ ) и ПВП (средняя разность = - 0,6800 при  $p=0,000$ ). В свою очередь данные виды пленок и МКЛ эффективнее, чем 0,3% капли Ципролет, который имеет также недостаток в виде 4-разовой инстилляций. Средняя разность ПАК/МЦ составляет = - 0,7800 ( $p=0,0000$ ), ПВП = - 0,9400 ( $p=0,0000$ ) соответственно.

Данные на 7-ой день исследования температуры ANOVA и апостериорное исследования имели следующую картину (таблица 21). Присутствие равенства дисперсий при статистике Ливиня=6,605 подтвердил значение  $p=0,0000$ .

Таблица 21 – ANOVA и Апостериорное исследование на 7-ой день

Группа	n	Me	SD	Станд ошибка	95% ДИ	
					Нижняя граница	Верхняя граница
1	2	3	4	5	6	7
Контроль	10	39,640	0,6204	0,1962	39,196	40,084
Патологи я	10	39,280	0,7421	0,2347	38,749	39,811
Лечение Ципролет	10	39,880	0,1033	0,0327	38,806	39,954

Продолжение таблицы 21

1	2	3	4	5	6	7
Лечение Pluronic	10	39,270	0,2312	0,0731	39,105	39,435
Лечение МКЛ с ЦФ	10	39,600	0,2828	0,0894	39,398	39,802
Лечение ПАК/МЦ	10	39,660	0,2836	0,0897	39,457	39,863
Лечение ПВП	10	39,850	0,1841	0,0582	39,718	39,982
Итог	70	39,731	0,4998	0,0597	39,335	39,573
Критерий однородности дисперсий						
Крите рий	Сумма квадратов	Степени свободы	Средний квадрат	F	p	
Между группами	6,488	6	1,081	6,339	0,0000	
Внутри групп	10,746	63	0,171			
Апостериорное исследование температуры на 7 день						
Гру ппа	Сравнива емые группы (J)	Разность Средних (I-J)	Станд ошибка	P	95%	
					Доверит интер	
					НГ	ВГ
Кон трол ь	Капли	0,7600*	0,1989	0,040	0,031	1,489
Леч ение капл ями	Контроль	-0,7600*	0,3059	0,040	-1,489	-0,031
	Pluronic	-0,3900*	0,0801	0,005	-0,668	-0,112
	Леч МКЛ	-0,7200*	0,0952	0,0000	-1,057	-0,383
	ГЛП ПАК/МЦ	-0,7800*	0,0955	0,0000	-1,117	-0,443
	ГЛП ПВП	-0,9700*	0,0667	0,0000	-1,198	-0,742
Plu ronic	Капли	0,3900*	0,0801	0,005	0,112	0,668
	ГЛП ПАК/МЦ	-0,3900*	0,1157	0,045	-0,774	-0,006
	ГЛП ПВП	-0,5800*	0,0935	0,0000	-0,891	-0,269
МК Л	Капли	0,7200*	0,0952	0,0000	0,383	1,057
ГЛП ПА К/ МЦ	Капли	0,7800*	0,0955	0,0000	0,443	1,117
	Pluronic	0,3900*	0,1157	0,045	0,006	0,774
ГЛП ПВ П	Капли	0,9700*	0,0667	0,0000	0,742	1,198
	Pluronic	0,5800*	0,0935	0,0000	0,269	0,891
*Разность средних значима на уровне 0,0007						

Апостериорное исследование (с поправкой Бонферрони=0,0007) в этот день выдал следующие результаты температурных данных (таблица 21). В динамике температура показывает одинаковые результаты с предыдущими



данными. Так четвертая группа, получавшая лечение in situ gel Pluronic F127 (средняя разность составляет  $= -0,5800$  при  $p=0,0000$ ), эффективно сохраняет достоверно значимое отличие от группы ГЛП на основе ПВП. В сравнении с группой стандартного лечения каплями эта средняя разность интерпретируется также в пользу геля со средним значением  $= 0,3900$  ( $p=0,0000$ ). Третья группа уступает в эффективности группам МКЛ, ГЛП на основе ПАК/МЦ и ГЛП на основе ПВП. Группа кроликов с лечением гель-раствором, имеет существенную эффективность в свою пользу, чем группа стандартного лечения каплями при  $p=0,0000$ . А лечение каплями по эффективности уступает группам с лечением МКЛ, ГЛП на основе ПАК/МЦ и ПВП ( $p=0,0000$ ).

Заключительный результат ANOVA 10-го дня представлен в таблице 22, где статистика Ливиня= $2,372$  ( $p=0,0000$ ). Равенство дисперсий соблюдено, и критерии Уэлча и Брауна-Форсайта на уровне  $p=0,0000$ .

Таблица 22 – ANOVA 10-ый день и Апостериорное исследование

Группа	n	Me	SD	Станд ошибк а	95% ДИ	
					Ниж Гр	Вер Гр
1	2	3	4	5	6	7
Контроль	10	39,320	0,5245	0,1659	38,945	39,695
Патология	10	39,060	0,5719	0,1809	38,651	39,469
Лечение Ципро мед	10	39,620	0,0789	0,2490	38,564	38,676
Лечение Pluronic	10	38,650	0,3064	0,0969	38,431	38,869
Лечение МКЛ с ЦФ	10	39,270	0,3093	0,0978	39,049	39,491
Лечение ПАК/МЦ	10	39,200	0,3162	0,1000	38,974	39,426
Лечение ПВП	10	39,190	0,2514	0,0795	39,010	39,370
Итог	70	39,044	0,4461	0,0533	38,938	39,151
Критерий однородности дисперсий						
Крите рий	Сумма квадрато в	Степени свободы	Средний квадрат	F	p	
Между группами	5,082	6	0,847	6,168	0,0000	
Внутри групп	8,651	63	0,137			
Апостериорное сравнение средних значений температуры 10-ый день						
Группа (I)	Сравн иваем ые Группы (J)	Разность Средних (I-J)	Стандарт ошибка	P	95% Доверит интер	
					Ниж гран	Верх гран

Продолжение таблицы 22

1	2	3	4	5	6	7
Контроль	Капли	0,7000*	0,1677	0,024	0,084	1,316
	Pluronic	0,6700*	0,1921	0,042	0,017	1,323
Лечение каплями	Контроль	0,7000*	0,1677	0,024	-1,316	-0,084
	Леч МКЛ	-0,6500*	0,1009	0,0004	-1,014	-0,286
	ГЛП ПАК/МЦ	-0,5800*	0,1031	0,013	-0,953	-0,207
	ГЛП ПВП	-0,5700*	0,0833	0,0001	-0,868	-0,272
Pluronic F127	Контроль	-0,6700*	0,1921	0,042	-1,323	-0,017
	Леч МКЛ	-0,6200*	0,1377	0,0004	-0,587	-0,165
	ГЛП ПАК/МЦ	-0,5500*	0,1392	0,013	-0,616	-0,090
	ГЛП ПВП	-0,5400*	0,1253	0,002	-0,625	-0,124
5.МКЛ	Капли	0,6500*	0,1009	0,001	0,286	1,014
	Pluronic	0,6200*	0,1377	0,0004	0,165	1,075
6.ПАК/МЦ	Капли	0,5800*	0,1031	0,0003	0,207	0,953
	Pluronic	0,5500*	0,1392	0,013	0,090	1,010
ГЛП ПВП	Капли	0,4600*	0,0803	0,0001	0,194	0,726
	Pluronic	0,3300*	0,0885	0,023	0,035	0,625
*- Разность средних значима на уровне 0,0007						

На рисунке 14 изображено изменение температурной кривой на протяжении 10-ти дней в зависимости от исследуемой группы. Температурный пик на 2-ые сутки после нанесения травмы, был зафиксирован только в 4-ой группе с последующим динамичным снижением до конца эксперимента. Группа с патологией роговицы без лечения не показала положительной динамики, так как температура оставалась на одинаковом уровне – повышенной на протяжении практически всего эксперимента. Пик температуры на 3-ьи сутки был зарегистрирован в 2-х группах: с лечением каплями и МКЛ. Как видно из рисунка, единственной группой с пиком на 4-5 сутки является ГЛП на основе ПВП, но снижение температуры в данной группе было отмечено на более чем на 1 градус в сравнении с первыми сутками. 6-ая

группа, получавшие лечение ГЛП-ками на основе ПАК/МЦ зафиксировала снижение температуры только спустя 6 сутки, и температурного пика не наблюдаем, потому что кривая сглажена. Контрольная группа также не имеет температурного пика.

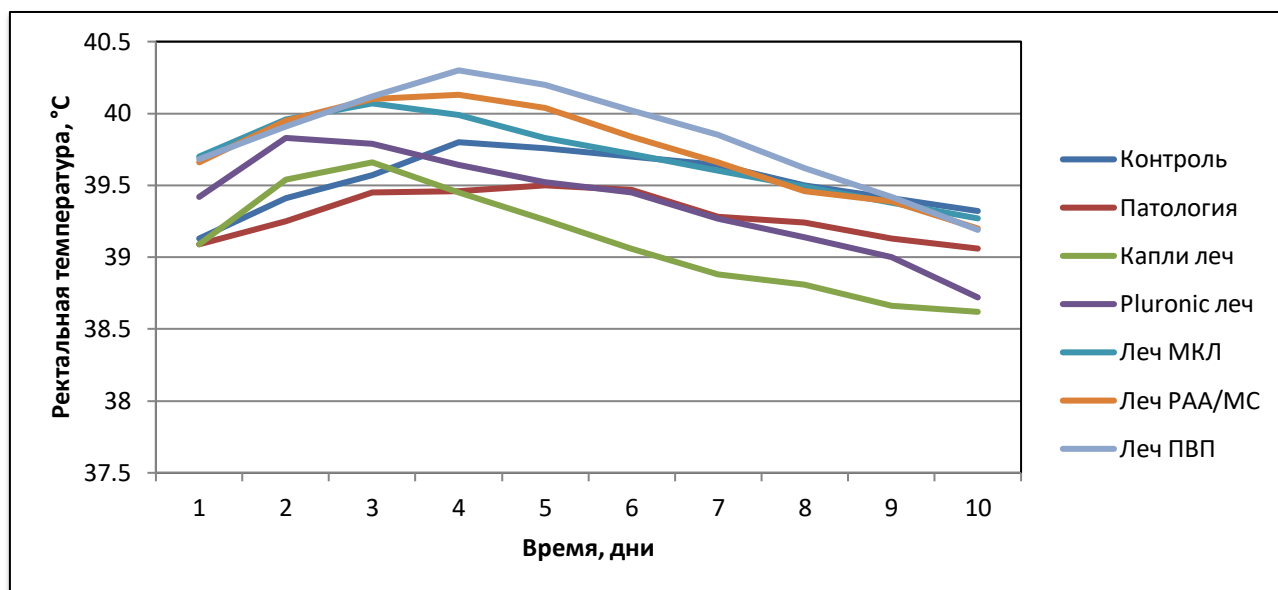


Рисунок 14 – Изменение температуры кроликов в экспериментальных группах в зависимости от времени, прошедшего с момента нанесения травмы на роговицу

Результаты анализа ANOVA и апостериорного исследования температурных данных подтвердили гипотезу о влиянии глазной лекарственной формы на эффективность лечения: так температурная кривая в группе со стандартным лечением каплями Ципролет с достоверной разницей отличается от температуры групп МКЛ и ГЛП на основе ПВП, тогда как МКЛ и ГЛП на основе ПВП имели значимую разницу с группой Pluronic F127.

#### **Сравнительный анализ показателей КОЕ кроликов в зависимости от экспериментальной группы**

Показатель КОЕ кроликов подлежал нормальному распределению, поэтому все статистические анализы были обработаны параметрическими методами дисперсионного анализа. Как видно из таблицы 23, во всех группах через сутки после травмы развитие гнойного процесса было различным, так наибольший рост бактерий был отмечен в группе Pluronic F127, что на 2,7 больше группы контроля. Тенденция большего роста числа бактерий во второй день остается в четвертой и третьей группах (среднее=7,8 при  $p=0,001$ ). Между 2-ми и 3-ми сутками было зафиксировано снижение уровня стафилококка в группах – лечение каплями и Pluronic F127 на 0,9 и 0,2 соответственно, тогда как в остальных группах продолжался рост. Пик уровня стафилококка на протяжении 10 дней наблюдения в группе с патологией без лечения был

зафиксирован на 5 день. Несмотря на длительное пребывание на поверхности роговицы ГЛП на основе ПАК/МЦ (среднее КОЕ=7,0 при  $p=0,001$ ) и ПВП (среднее КОЕ=7,3 при  $p=0,001$ ) рост бактерий продолжался до 4 дня эксперимента. С момента нанесения травмы лечение МКЛ, содержащими ЦФ и длительным удерживанием в течении 50 минут, показал следующие результаты: максимальный рост до 3-го дня (при  $p=0,001$  среднее КОЕ=7,2) с последующим динамичным снижением. Самый лучший результат в данном критерии мы можем увидеть из нижеследующей таблицы, которая демонстрирует пик КОЕ на 2 сутки только в единственной подопытной группе, где лечение гелеобразующими каплями Pluronic F127 (среднее КОЕ 7,8 при  $p=0,001$ ). В первой группе, где животные наблюдались без патологии и без лечения, доверительный интервал составил в диапазоне 3,1-4,1. Сравнивая данные показателей КОЕ на 10-е сутки наблюдения, низкий уровень *Staphylococcus aureus* был зафиксирован также в 4-ой группе (КОЕ сред=2,0,  $p=0,001$ ). Наибольший показатель (КОЕ сред=4,6,  $p=0,001$ ) остался в группе с патологией и без лечения.

Рисунок 15 отображает изменения показателей КОЕ в зависимости от группы, на которой хорошо видны пики роста бактерий и его снижение. После нанесения травмы, в течении первых суток у всех кроликов с травмами глаза наблюдается резкое снижение уровня КОЕ *Staphylococcus aureus*, и начиная со второго дня фиксировались подъёмы. Группа контроля сохраняла уровень стафилококка на протяжении всего времени наблюдения в диапазоне 3,3-3,9. Животные, которые подлежали травматизации без лечения, имели волнообразное изменение. Как видно из рисунка 14, пик пришелся на 5-ые сутки, и на конец эксперимента именно данная группа обладала наивысшим уровнем бактерий. Стандартное лечение в сравнении с гелеобразующим раствором Pluronic F127, имело схожую кривую в первые 2-ое суток. Но в процессе наблюдения мы видим, что в 3-ей группе животных снижение КОЕ было ступенчатым, тогда как 4-ая группа динамично, плавно достигла наименьшего уровня стафилококка=2,0 в слизистые глаза. Разброс КОЕ на 10-ый день в диапазоне 2,9-3,3 отмечен в 5-ой, 6-ой и 7-ой группах. Таким образом, длительное время пребывания на поверхности глаза мукоадгезивных ГЛФ, соответствует полученным результатам.

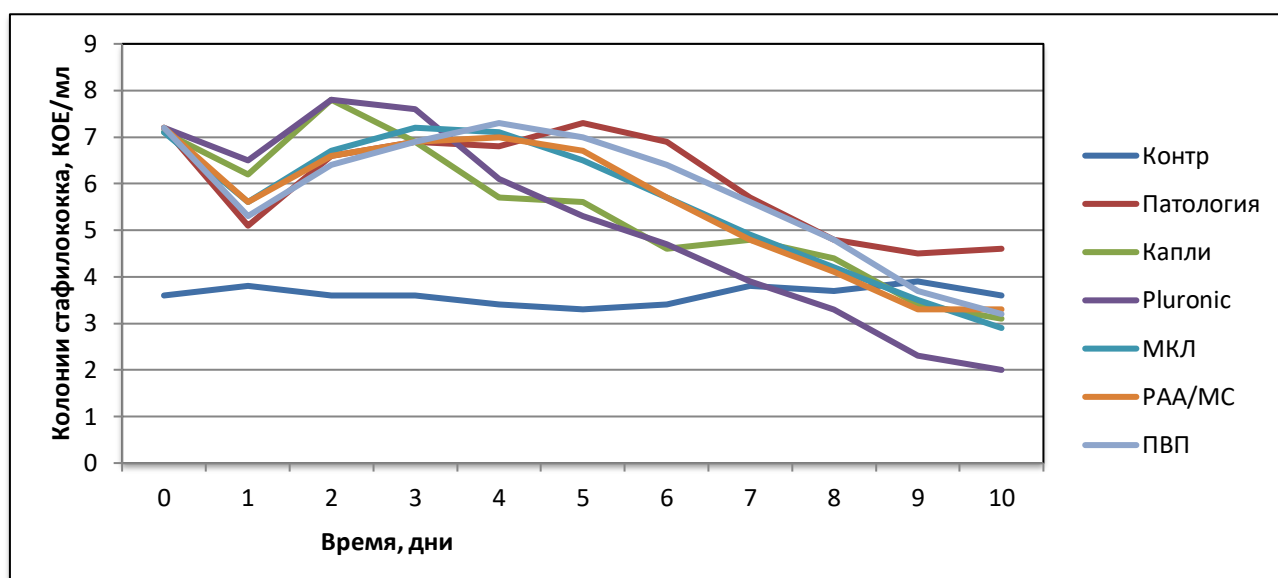


Рисунок 15 – Изменение уровня стафилококка (КОЕ) в глазах кроликов в экспериментальных группах (с лечением и без) в зависимости от времени

Таблица 23- Показатели среднего значения КОЕ кроликов в течении 10 дней

Дни	Группа 1			Группа 2			Группа 3			Группа 4			Группа 5			Группа 6			Группа 7		
	Сре д	ДИ ниж	ДИ верх	Сред	ДИ ниж	ДИ верх	Сре д	ДИ ниж	ДИ верх	Ср ед	ДИ ниж	ДИ вер х	Сре д	ДИ ниж	ДИ верх	Сре д	ДИ ни ж	ДИ вер х	Сре д	ДИ ни ж	ДИ вер х
1	3,8	3,5	4,1	5,1	4,6	5,7	6,2	5,0	7,4	6,5	5,9	7,1	5,6	4,7	6,4	5,6	4,9	6,3	5,3	4,3	6,3
2	3,6	3,2	4,0	6,6	5,9	7,3	7,8	7,3	8,3	7,8	7,1	8,5	6,7	6,1	7,3	6,6	6,1	7,1	6,4	5,7	7,1
3	3,6	3,2	4,0	6,9	5,5	8,3	6,9	6,0	7,8	7,6	6,8	8,4	7,2	6,8	7,6	6,9	6,4	7,3	6,9	6,3	7,4
4	3,4	3,0	3,8	6,8	5,5	8,1	5,7	4,6	6,8	6,1	5,4	6,8	7,1	6,6	7,6	7,0	6,6	7,5	7,3	7,0	7,7
5	3,3	3,0	3,6	7,3	6,4	8,2	5,6	4,7	6,4	5,3	4,9	5,6	6,5	6,0	7,1	6,7	6,1	7,3	7,0	6,6	7,3
6	3,4	3,0	3,8	6,9	5,7	8,1	4,6	3,5	5,7	4,7	4,1	5,3	5,7	5,2	6,2	5,7	5,2	6,2	6,4	6,0	6,7
7	3,8	3,5	4,1	5,7	4,3	7,1	4,8	3,4	6,1	3,9	3,4	4,4	4,9	4,4	5,3	4,8	4,5	5,0	5,6	5,2	6,0
8	3,7	3,4	4,0	4,8	3,6	6,0	4,4	3,7	5,1	3,3	2,8	3,8	4,2	3,8	4,6	4,1	3,7	4,5	4,8	4,5	5,0
9	3,9	3,7	4,1	4,5	3,6	5,4	3,4	2,7	4,2	2,3	1,7	3,0	3,5	3,3	3,7	3,3	3,0	3,6	3,7	3,5	4,0
10	3,6	3,2	4,0	4,6	3,6	5,6	3,1	2,6	3,6	2,0	1,4	2,6	2,9	2,6	3,3	3,3	3,0	3,6	3,2	2,9	3,6
Критерий однородности дисперсий																					
Робастные критерии однородности дисперсий																					
Критерий				Критерий Фишера, F				Критерий Уэлча <sup>а</sup>				Критерий Брауна-Форсайта				p					
Между группами 1 день				5,996				16,151				5,996				0,000					
Между группами 2 день				28,103				48,415				28,103				0,000					
Между группами 3 день				15,613				48,622				15,613				0,000					
Между группами 4 день				16,062				54,158				16,062				0,000					
Между группами 5 день				26,135				53,789				26,135				0,000					
Между группами 6 день				13,498				31,018				13,498				0,000					
Между группами 7день				4,326				12,567				4,326				0,000					
Между группами 8 день				4,016				8,819				4,016				0,000					
Между группами 9 день				7,494				5,866				7,494				0,000					
Между группами 10 день				10,081				5,738				10,081				0,000					
а-Асимптотически тремится к F-распределению																					

Среднее значение КОЕ на момент нанесения травмы (0 день) в контрольной группе имеет статистически значимую разницу при  $ME=3,6$  ( $p=0,000$ ), так как животным данной группы мы не заносили колонии стафилококка. Но бактериологический анализ посева показывает наличие в малых количествах золотистого стафилококка. Поэтому сравнение всех остальных 6-ти подопытных групп, в которых присутствовало заражение, показывает значимую разницу только в 2 группах: в третьей с лечением стандартными каплями 0,03% - Ципролет среднее значение КОЕ на 0,03 меньше ( $Me=7,18$  при  $p=0,025$ ), чем в четвертой с лечением гелеобразующим раствором ( $Me=7,21$  при  $p=0,026$ ).

Развитие гнойного процесса у всех 60 кроликов в 6-ти различных группах в течении первых суток было различным, также как их лечение. Учитывая нормальное распределение данных КОЕ, сравнительный анализ проведен с применением дисперсионного анализа ANOVA, который показал различия в уровне стафилококка между исследуемыми группами, имеет статистически значимую разницу. При этом, если равенства дисперсии не наблюдалось, мы проводили робастные тесты на равенство средних с применением критериев Уэлча и Брауна-Форсайта. Таблица 24 отражает данные показателей КОЕ на первые сутки после травмы, перед началом лечения.

Таблица 24 – ANOVA данные и Апостериорное исследование на 1-ые сутки

Группа	n	Средн ее	SD	Станд ошибка	95% ДИ	
					Нижняя граница	Верхняя граница
1	2	3	4	5	6	7
Контроль	10	3,8	0,42	0,13	3,5	4,1
Патологи я	10	5,1	0,79	0,25	4,6	5,7
Лечение Ципролет	10	6,2	1,69	0,53	4,98	7,40
Лечение Pluronic	10	6,5	0,92	0,29	5,83	7,14
Лечение МКЛ ЦФ	10	5,6	1,20	0,38	4,71	6,43
Лечение ПАК/МЦ	10	5,6	1,00	0,32	4,85	6,29
Лечение ПВП	10	5,3	1,35	0,43	4,32	6,26
Итог	70	5,4	1,34	0,16	5,11	5,75
Критерий однородности дисперсий						
Критерий		Сумма квадра тов	Степени свободы	Средний квадрат	F	p
Между группами		45,119	6	7,520	5,996	0,000
Внутри групп		79,017	63	1,254		
Апостериорное сравнение средних значений КОЕ 1-ый день						
Гру ппы	Сравн груп (J)	Раз сред (I-J)	Стан ошиб	P	95% ДИ	
					НГ	ВГ

Продолжение таблицы 24

1	2	3	4	5	6	7
Контроль	Патология	-1,321*	0,283	0,002	-2,601	-0,410
	Pluronic	-2,690*	0,319	0,000	-4,167	-1,212
	РАА/МС	-1,772*	0,344	0,002	-3,381	-0,162
Патология	Контроль	1,321*	0,283	0,002	0,041	2,601
Pluronic	Контроль	2,690*	0,319	0,000	1,212	4,167
РАА/МС	Контроль	1,772*	0,344	0,002	0,162	3,381
*Средняя разность значима на уровне Бонферони 0,0017						

Апостериорное сравнение этих же средних показателей КОЕ было проведено при помощи критерия Геймса-Хоуэла. Учитывая наличие поправки Бонферони, контрольная группа имела отличия от патологии, группы Pluronic F127 и МКЛ (таблица 24).

Данные ANOVA КОЕ на 3 день представлены в нижеследующей таблице 25. Однородность дисперсии составила при статистике Ливиня=4,057 ( $p=0,000$ ). Статистически значимые отличия были зафиксированы у группы контроля со всеми подопытными группами, которые получали лечение различными ГЛФ ( $p=0,001$ ).

Таблица 25 – ANOVA данные и Апостериорное исследование на 3-ьи сутки

Группа	n	Среднее	SD	Станд. ошибка	95% ДИ	
					Нижняя граница	Верхняя граница
Контроль	10	3,6	0,52	0,16	3,2	3,9
Патология	10	6,9	1,92	0,61	5,5	8,3
Лечение Ципролет	10	6,9	1,23	0,39	6,0	7,8
Лечение Pluronic	10	7,6	1,10	0,35	6,8	8,4
Лечение МКЛ ЦФ	10	7,2	0,53	0,17	6,8	7,6
Лечение ПАК/МЦ	10	6,9	0,63	0,20	6,4	7,3
Лечение ПВП	10	6,9	0,79	0,25	6,3	7,5
Итог	10	6,7	1,61	0,19	6,2	6,9
Критерий однородности дисперсий						
Критер	Сумма кв	Степ св	Сред кв		F	p
Между группами	106,602	6	17,767		15,613	0,000
Внутри групп	71,694	63	1,138			



Продолжение таблицы 25

1	2	3	4	5	6	
Апостериорное исследование на 3-ьи сутки						
Группа	Сравниваемые Группы (J)	Разность Средних (I-J)	Стандар т ошибка	Р	95% Доверит интер	
					Ниж гран	Верх гран
Контроль	Патология	-3,298*	0,627	0,004	-5,559	-1,036
	Капли	-3,290*	0,421	0,001	-4,764	-1,816
	Pluronic	-3,990*	0,384	0,001	-5,321	-2,658
	МКЛ	-3,590*	0,233	0,001	-4,361	-2,818
	ПАК/МЦ	-3,290*	0,258	0,001	-4,147	-2,432
	ПВП	-3,290*	0,298	0,001	-4,293	-2,286
*Средняя разность значима на уровне Бонферони 0,0017						

Как видно из таблицы 27, средние показатели КОЕ через 7 суток от начала лечения также имели значимые отличия. Статистика Ливиня=10,895 ( $p=0,000$ ) указывает на однородность дисперсии. Апостериорное сравнение средних показателей КОЕ показывает, что лечение МКЛ, ГЛП на основе ПАК/МЦ и ГЛП на основе ПВП уступают гелеобразующему раствору Pluronic F127 на уровне  $p=0,001$  (таблица 26). В свою очередь МКЛ с ЦФ и ГЛП на основе ПАК/МЦ эффективнее, чем ГЛП на основе ПВП ( $p=0,001$ ). В основу сравнения эффективности лечения, применяя критерий КОЕ, мы заложили сравнение всех групп со стандартными каплями Ципролет 0,3% (Доктор Редди'с).

Таблица 26 – ANOVA данные и Апостериорное исследование КОЕ на 7-ой день

Группа	n	Сре днее	SD	Станд ошибка	95% ДИ	
					Нижняя граница	Верхняя граница
1	2	3	4	5	6	7
Контроль	10	3,8	0,42	0,13	3,50	4,10
Патология	10	5,7	2,00	0,63	4,26	7,12
Лечение Ципролет	10	4,8	1,82	0,58	3,44	6,05
Лечение Pluronic	10	3,9	0,71	0,22	3,37	4,38
Лечение МКЛ	10	4,9	0,62	0,20	4,43	5,32
ПАК/МЦ	10	4,8	0,32	0,10	4,54	5,00
Лечение ПВП	10	5,6	0,57	0,18	5,18	6,00
Итог	10	4,8	1,28	0,15	4,46	5,07
Критерий однородности дисперсий						
Критерий	Сумма квадра тов	Степени свободы	Средний квадрат	F	p	
Между группами	12,567	6	27,371	4,326	0,001	
Внутри групп	4,326	63	25,385			
Апостериорное сравнение средних значений КОЕ 7-ой день						

Продолжение таблицы 26

1	2	3	4	5	6	
Группа	Сравниваемые Группы (J)	Разность Средних (I-J)	Стандарт ошибка	P	95% Доверит интер	
					Ниж гран	Верх гран
Контроль	МКЛ	-1,072*	0,238	0,001	-1,871	-0,272
	ПАК/МЦ	-0,972*	0,168	0,000	-1,532	-0,411
	ПВП	-1,790*	0,223	0,000	-2,536	-1,044
Pluronic	МКЛ	-0,998*	0,299	0,001	-1,998	-0,008
	ПАК/МЦ	-0,898*	0,247	0,002	-1,755	-0,040
	ПВП	-1,716*	0,286	0,000	-2,671	-0,760
МКЛ	Контроль	1,072*	0,238	0,001	0,272	1,871
	Pluronic	0,998*	0,299	0,002	0,008	1,998
ПАК/МЦ	Контроль	0,972	0,168	0,000	0,411	1,532
	Pluronic	0,898	0,247	0,002	0,040	1,755
	ПВП	-0,818	0,206	0,001	-1,521	-0,114
ПВП	Контроль	1,790	0,223	0,000	1,044	2,536
	Pluronic	1,716	0,287	0,000	0,760	2,671
	ПАК/МЦ	0,818	0,206	0,001	0,114	1,521
*Средняя разность значима на уровне Бонферони 0,0017						

Конечные результаты средних показателей КОЕ на 10-ый день также имели значимые отличия, которые отражены в таблице 27. Статистика Ливиния=4,360 ( $p=0,001$ ) подвергло проведение робастных тестов с применением критериев Уэлча=5,738 ( $p=0,001$ ) и Брауна-Форсайта=10,081 ( $p=0,000$ ). Минимальное среднее значение КОЕ на уровне 2,03 мы наблюдали при применении *in situ gel* Pluronic F127, и максимальное=4,6 в группе патологии без лечения. Апостериорное сравнение средних показателей КОЕ также отображены в таблице 28, который показывает, что лечение Pluronic F127 дает наилучший результат, что доказывает сравнение с контрольной группой ( $p=0,002$ ) и без лечения ( $p=0,0002$ ). Это достоверно значимо в сравнении с ГЛП на основе ПАК/МЦ ( $p=0,001$ ) и ГЛП на основе ПВП ( $p=0,0002$ ), уступающие в эффективности. МКЛ, пропитанные ЦФ, дали значимые различия в сравнении с патологией без лечения ( $p=0,002$ ).

Таблица 27 – ANOVA данные 10-ые сутки

Группа	n	Среднее	SD	Станд ошибка	95% ДИ	
					Нижняя граница	Верхняя граница
1	2	3	4	5	6	7
Контроль	10	3,6	0,52	0,16	3,2	3,9
Патология	10	4,6	1,42	0,45	3,6	5,6
Лечение Ципролет	10	3,1	0,71	0,22	2,6	3,6

Продолжение таблицы 27

1	2	3	4	5	6	7
Лечение Pluronic	10	2,0	0,84	0,27	1,4	2,6
Лечение МКЛ ЦФ	10	2,9	0,50	0,16	2,6	3,3
Лечение ПАК/МЦ	10	3,3	0,39	0,12	3,0	3,6
Лечение ПВП	10	3,2	0,50	0,16	2,9	3,6
Итог	10	3,3	1,03	0,12	3,0	3,5
Критерий однородности дисперсий						
Критерий	Сумма квадратов		Степени свободы	Средний квадрат	F	p
Между группами	35,822		6	5,970	10,081	0,000
Внутри групп	37,313		63	0,592		
Группа	Сравниваемые Группы (J)	Разность Средних (I-J)	Стандарт ошибка	P	95% Доверит интер	
					Ниж гран	Верх гран
Контроль	Pluronic	1,563*	0,313	0,001	0,503	2,622
Патология	Pluronic	2,580*	0,521	0,001	0,810	4,349
	МКЛ	1,695*	0,475	0,002	0,010	3,379
Pluronic	Контроль	-1,563*	0,313	0,002	-0,262	-0,503
	Патология	-2,580*	0,521	0,002	-4,349	-0,810
	ПАК/МЦ	-1,244*	0,293	0,001	-2,263	-0,224
	ПВП	-1,198*	0,310	0,002	-2,251	-0,144
МКЛ	Патология	-1,695*	0,475	0,002	-3,379	-0,010
ПАК/МЦ	Pluronic	1,244*	0,293	0,001	0,224	2,263
ПВП	Pluronic	1,198*	0,310	0,001	0,144	2,251
				8		
*Средняя разность значима на уровне Бонферони 0,0017						

Таким образом, результаты данного этапа проведенных исследований свидетельствуют о присутствии статистически значимой разницы в эффективности лечения в группе Pluronic F127, которое можно сопоставлять с результатами лечения ГЛП с ЦФ.

#### **Анализ влияния типа лечения на клинические показатели в виде слезотечения, гнойного отделяемого, гиперемии, отека и образование бельма на роговице**

Поскольку клинические проявления являются качественным показателем, мы преобразовали эти переменные в количественную шкалу. Для каждого клинического показателя были составлены значения, по которым мы наблюдали за течением экспериментальной гнойной язвы на протяжении 10 суток с лечением и без него. Данные значения представлены в таблице 28.

Таблица 28 – Значения клинических показателей в зависимости от степени проявлений

Клинические проявления	«0»	«1»	«2»	«3»
Гиперемия	отсутствует	Слабовыражен	Умеренный	Выраженный
Гнойное отделяемое	отсутствует	слабовыражен	умеренный	Выраженный
Клинические проявления	«0»		«1»	
Слезотечение	Отсутствует		присутствует	
Отек	отсутствует		Присутствует	

Одним из методов проведения фундаментальных экспериментальных исследований в фармакологии является наблюдение клинического течения заболевания с применением лечения различных лекарственных форм. В нашем исследовании мы провели изучение взаимосвязи различных глазных лекарственных форм и течения модельной язвы роговицы. Вторая группа животных, где отсутствовало лечение, была принята по умолчанию за основу для сравнения эффективности лечения. Так, через сутки после травмы с занесением стафилококка, в 100% случаев развилась гнойная экспериментальная язва роговицы. Слабо выраженная гиперемия у 44,3 % животных распределилась следующим образом (рисунок 16: 2-ая с патологией без лечения в 2,9% случаев (n=2), в 3-ей -11,4% (n=8), 4-ая – 8,6% (n=6), в 5-ой, 6-ой и 7-ой одинаковое количество по 7,1% (n=5). В группах, где применялось лечение МКЛ и ГЛП на основе ПВП отсутствовала гиперемия в 1,4% (n=1) и 2,9% (n=2) соответственно, что составило 18,6% от общего числа кроликов. 31,4 % кроликов в 1 день имели умеренную степень гиперемии: в группе патологии 10% (n=7), в 3-ей и 7-ой группах по 2,9% (n=2), в 4-ой и 6-ой – 5,7% (n=4), в 5-ой это соотношение составило 5,7% (n=4). Выраженная гиперемия была зафиксирована меньше всего, по одному 1,4% во 2-ой, 5-ой, 6-ой и 7-ой группах (n=1) ( $\chi^2=65,140$ ;  $p=0,001$ ).

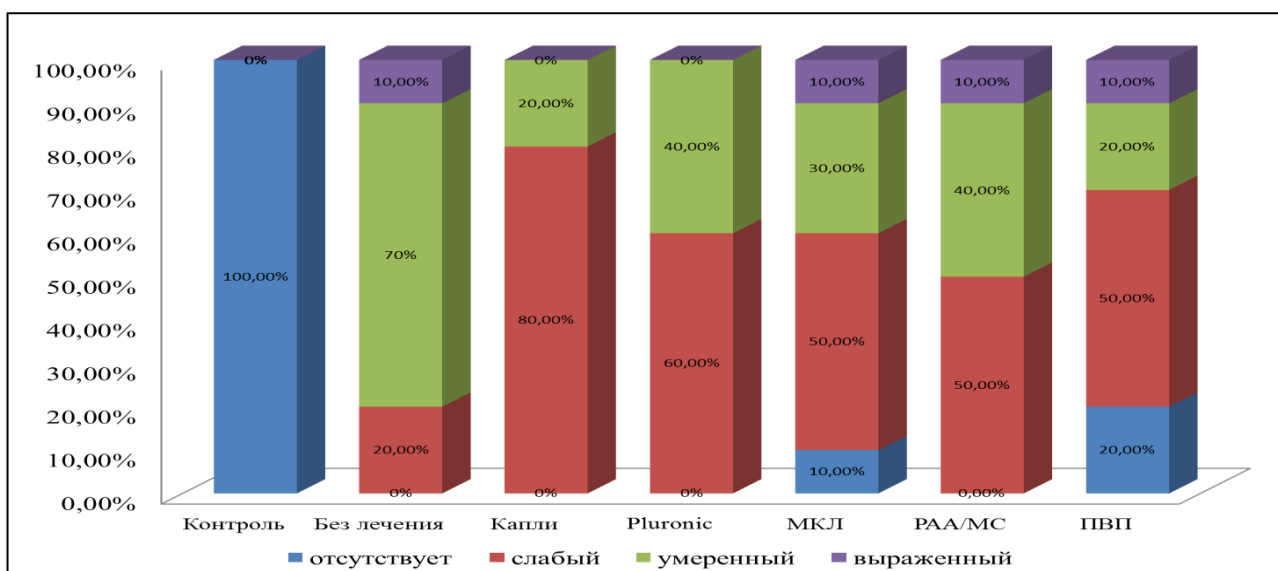


Рисунок 16 – Гиперемия на 1-ые сутки наблюдения в зависимости от групп

Как видно из рисунка 17, на 3-ий день только в контрольной группе не наблюдалось гиперемии и слабовыраженная отмечалась в 2 исследуемых группах, где проводилось лечение каплями и гелеобразующим раствором по 1,4% (n=1). В группе патологии без лечения больше всех зафиксировали выраженную гиперемию у 11,4% (n=8) и меньше всего в 3-ей группе 2,9% (n=2). Умеренная и выраженная степень гиперемии наблюдалась в одинаковой пропорции по 41,4% (n=29) ( $\chi^2=84,724$ ;  $p=0,001$ ).

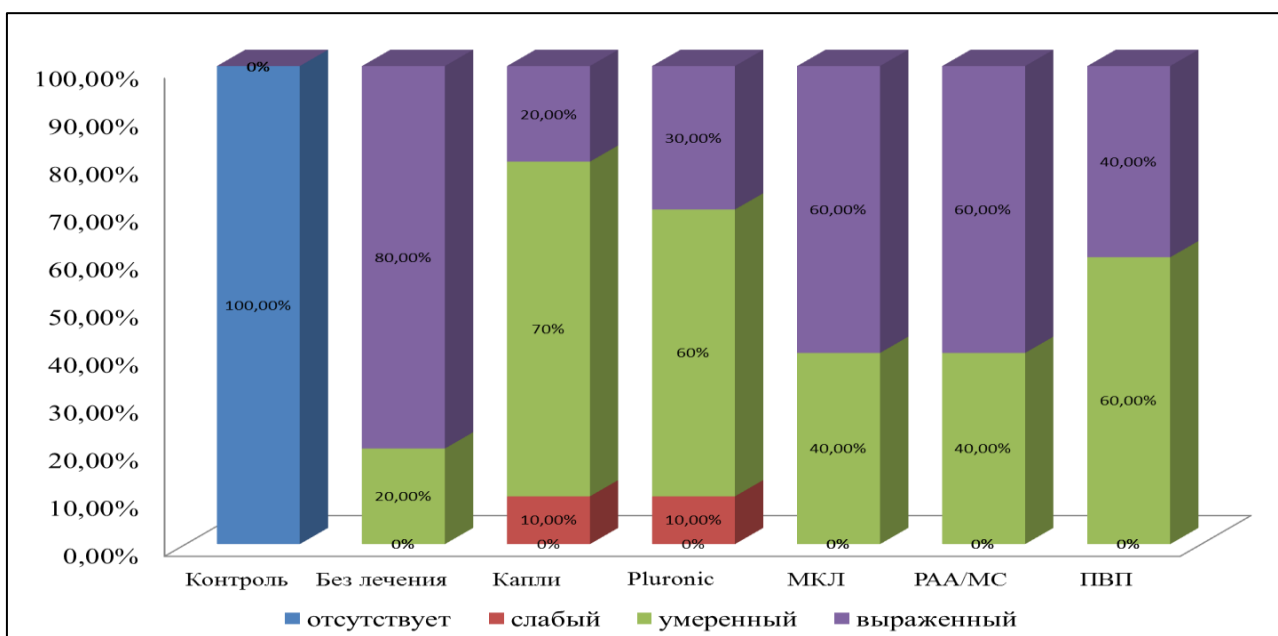


Рисунок 17 – Гиперемия на 3-ьи сутки наблюдения в зависимости от групп

Частота умеренной гиперемии на 7 сутки в группах составили 44,3% (n=31), при этом 14,3% (n=10) выпало на долю 7 группы – ГЛП на основе ПВП, во 2-ой и 3-ей группах этот показатель был на уровне 12,9% (n=9) и 11,4% (n=8)

соответственно. Абсолютное отсутствие гиперемии в 4-ой группе было в 9 раз ниже и статистически значимо ( $\chi^2 = 108,229$ ,  $p=0,001$ ), чем в 3-ей. При стандартном лечении каплями клиническая картина в виде гиперемии, являющийся одним из критериев оценки воспалительного процесса, сохранял в своем большинстве умеренную степень, тогда как отсутствие и выраженная гиперемия была по 1 случаю в 1,4% ( $n=1$ ). Частота слабо выраженной гиперемии в 11,4% ( $n=8$ ) была характерна для лечения МКЛ с ЦФ-ном и в 10% ( $n=7$ ) для ГЛП на основе ПАК/МЦ (рисунок 18).

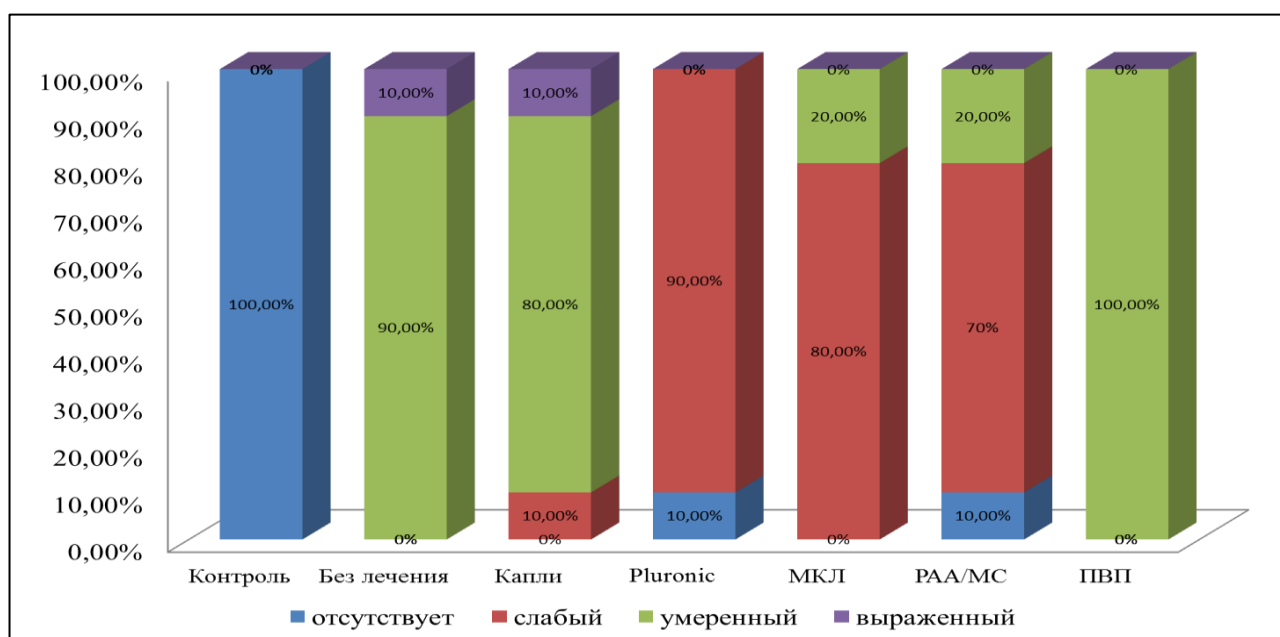


Рисунок 18 – Гиперемия на 7-ые сутки в зависимости от групп

В последний день лечения соотношение разных уровней гиперемии расположились следующим образом (рисунок 19). В 55,7% ( $n=39$ ) случаев гиперемия отсутствовала, тогда как в 30% ( $n=21$ ) была слабо выраженной и у 14,3% ( $n=10$ ) кроликов была умеренной. У подопытных животных без лечения сохранилась гиперемия: умеренная в 10% ( $n=7$ ), слабо выраженная у 4,3% ( $n=3$ ). При стандартном лечении каплями удельный вес умеренной гиперемии наоборот составил 4,3% ( $n=3$ ) и у 10% ( $n=7$ ) слабо выраженный. В 4-ой группе 2,9% ( $n=2$ ) животных сохранили слабовыраженную гиперемию, в 5-ой же группе этому критерию соответствовал 1 кролик - 1,4%. ГЛП на основе ПАК/МЦ показали лучший результат – отсутствие какой-либо гиперемии вообще ( $\chi^2=75,574$ ;  $p=0,001$ ).

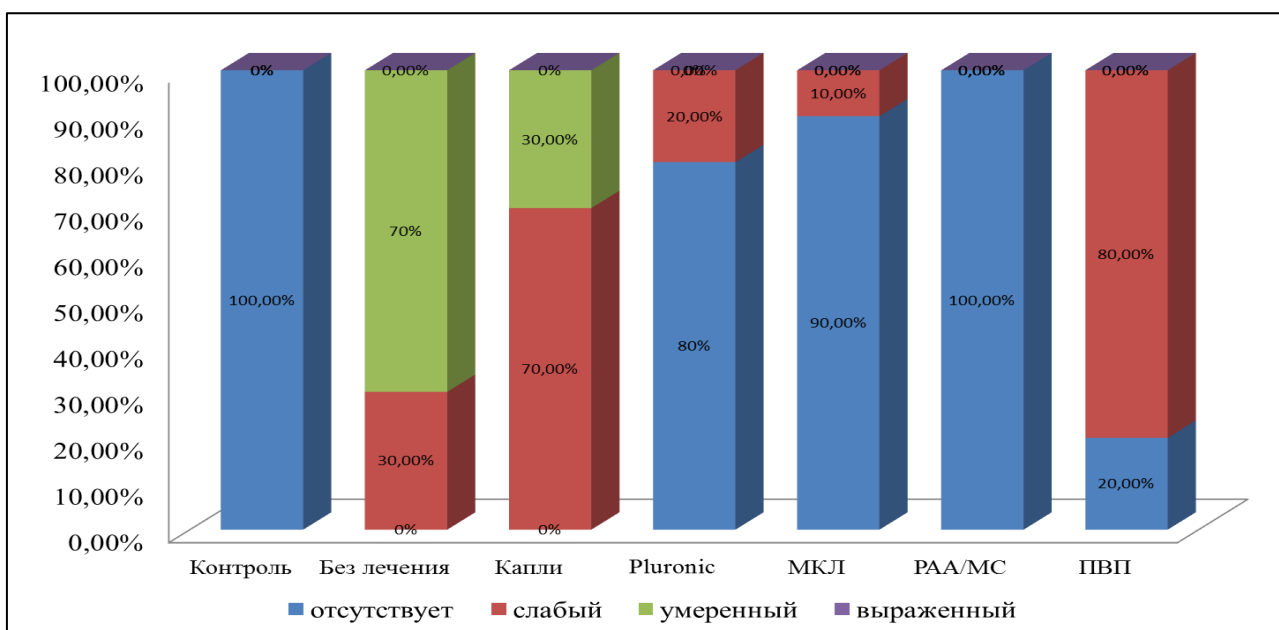


Рисунок 19 – Общий уровень гиперемии на 10-ые сутки

Для выявления взаимосвязи между уровнем гиперемии и ГЛФ-ой, применяемой для лечения, мы применили анализ таблиц сопряженности 2×2 (таблица 30). В качестве независимой переменной выступило наличие лечения стандартом – каплями и лечение мукоадгезивными ГЛФ-ми с фторхинолоновым антибиотиком; в качестве тяжести гиперемии было использовано 3 его уровня: 0-отсутствие, 1-слабовыраженный, 2-умеренно/выраженный; 3-ья графа была заполнена соответственно количеству кроликов в каждой градации. Как мы видим из таблицы 29, мы отвергаем гипотезу об отсутствии взаимосвязи между гиперемией и видом, применяемой ГЛФ-мы с ЦФ-ном. В 1-ый день эксперимента, с момента начала лечения сформировавшейся язвы роговицы, переменные с поправкой на уровне критерия тау-b-Кендала коррелировали положительно, что свидетельствует о наличии взаимосвязи уровня гиперемии и применяемого вида ГЛФ-мы. Чем больше показатель асимптотической стандартной ошибки, тем выраженная зависимость.

Таблица 29 –Результаты данных гиперемии на 1-ые, 3-ьи, 7-ые,10-ые сутки

Д н и	Критерии	Значение	Асимптотическа я значимость	Точная 2-стор значимость, р
1	$\chi^2$ Пирсона	33,895	0,001	0,001
	Точный Фишера	32,212	0,001	0,001
3	$\chi^2$ Пирсона	32,490 <sup>a</sup>	0,001	0,001
	Точный Фишера	30,466	0,001	0,001
7	$\chi^2$ Пирсона	108,229	0,001	0,001
	Точный Фишера	84,018	0,001	0,001

Продолжение таблицы 29

1	2	3	4	5	
10	$\chi^2$ Пирсона	91,765	0,000	0,000	
	Точный Фишера	84,888	0,000	0,000	
Примечание: а. Для числа ячеек 3 (3,75) предполагается значение, меньше 5. Минимальное предполагаемое число,57.					
Направленные меры					
Д н и		Значение	Асимпт среднеквад ошибка <sup>а</sup>	Приблизит. Ошибка Т <sup>б</sup>	Точная значимость, р
1	d Сомерса симмет	0,331	0,104	2,887	0,002
	Зависимая перем FR	0,273	0,086	2,887	0,002
	Независим перем TZ	0,420	0,137	2,887	0,002
3	d Сомерса симмет	0,239	0,131	1,760	0,003
	Зависимая перем FR	0,197	0,107	1,760	0,003
	Независим перем TZ	0,306	0,170	1,760	0,003
7	d Сомерса симмет	0,195	0,118	1,637	0,016
	Зависимая перем FR	0,171	0,104	1,637	0,016
	Независим перем TZ	0,227	0,136	1,637	0,016
10	d Сомерса симмет	0,401	0,075	4,451	0,000
	Зависимая перем FR	0,606	0,104	4,451	0,000
	Независим перем TZ	0,300	0,067	4,451	0,000
Примечание: а. Не предполагая нулевой гипотезы. б. Использование асимпт среднеквадратичной ошибки в предположении нулевой гипотезы.					
Симметричные меры					
1	Тау- b Кендалла	0,338	0,107	2,887	0,002
	Тау- c Кендалла	0,343	0,119	2,887	0,002
	Гамма	0,583	0,150	2,887	0,002
3	Тау- b Кендалла	0,245	0,134	1,760	0,003
	Тау- c Кендалла	0,250	0,142	1,760	0,003
	Гамма	0,393	0,201	1,760	0,003
7	Тау- b Кендалла	0,197	0,119	1,637	0,047
	Тау- c Кендалла	0,195	0,119	1,637	0,047
	Гамма	0,280	0,151	1,637	0,047
10	Тау- b Кендалла	0,427	0,080	4,451	0,000
	Тау- c Кендалла	0,386	0,087	4,451	0,000
	Гамма	0,624	0,107	4,451	0,000



На основании результатов мы можем сделать вывод о том, что проявление гиперемии в разной степени при гнойной язве роговицы зависит напрямую от формы глазных лекарств, применяемых при лечении.

Для испытания новых мукоадгезивных лекарственных форм, содержащих ЦФ, и определения его эффективности было проведен анализ таблиц сопряженности гнойного отделяемого в подопытных группах.

Таблица 30 – Показатели гнойного отделяемого в группах по дням

Д н и	Группа	Кол- во	«0»	«1»	«2»	«3»	$\chi^2$ , p
1	Контроль	10	14,3% (10)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	95,5 1 p=0, 001
	Патологии	10	0% (0)	0% (0)	14,3% (10)	0% (0)	
	Ципролет	10	0% (0)	1,4% (1)	10% (7)	2,9% (2)	
	Pluronic	10	0% (0)	0% (0)	12,9% (9)	1,4% (1)	
	МКЛ	10	0% (0)	5,7% (4)	7,1% (5)	1,4% (1)	
	ПАК/МЦ	10	0% (0)	5,7% (4)	7,1% (5)	1,4% (1)	
	ПВП	10	0% (0)	8,6% (6)	2,9% (2)	2,9% (2)	
3	Контроль	10	14,3% (10)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	92,0 2 p=0, 001
	Патологии	10	0% (0)	0% (0)	2,9% (2)	11,4%(8)	
	Ципролет	10	0% (0)	0% (0)	2,9% (2)	11,4%(8)	
	Pluronic	10	0% (0)	1,4% (1)	11,4% (8)	1,4%(1)	
	МКЛ	10	0% (0)	0% (0)	2,9% (2)	11,4%(8)	
	ПАК/МЦ	10	0% (0)	0% (0)	4,3% (3)	10% (7)	
	ПВП	10	0% (0)	1,4% (1)	2,9% (2)	10% (7)	
7	Контроль	10	14,3% (10)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	120, 32 p=0, 001
	Патологии	10	0% (0)	0% (0)	3=4,3%	10% (7)	
	Ципролет	10	0% (0)	1,4% (1)	10% (7)	2,9% (2)	
	Pluronic	10	1,4% (1)	11,4%( 8)	0% (0)	1,4% (1)	
	МКЛ	10	1,4% (1)	11,4% (8)	1,4% (1)	0% (0)	

Продолжение таблицы 30

1	2	3	4	5	6	7	8
	ПАК/ МЦ	10	0% (0)	9=12,9 %	1,4% (1)	0% (0)	
	ПВП	10	0% (0)	4,3%(3 )	10% (7)	0% (0)	
1 0	Контроль	10	14,3% (10)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	91,7 6 p=0, 001
	Патологии	10	0% (0)	0% (0)	10=14, 3%	0% (0)	
	Ципролет	10	1,4% (1)	5=7,1%	4=5,7%	0% (0)	
	Pluronic	10	10=14,3%	0% (0)	0% (0)	0% (0)	
	МКЛ	10	10=14,3%	0% (0)	0% (0)	0% (0)	
	ПАК/ МЦ	10	10=14,3%	0% (0)	0% (0)	0% (0)	
	ПВП	10	10=14,3%	0% (0)	0% (0)	0% (0)	

Как видно из таблицы 30, гнойное отделяемое на 1 сутки присутствовали во всех подопытных группах, но имели при этом статистически значимую различную степень его проявления. В группе патологии без лечения у всех 10 животных сразу развилось умеренное гнойное отделяемое, что составило 14,3% (n=10). Лечение каплями имели отличия: в большей степени у 10% (n=7) был умеренный, слабовыраженный у 1 кролика – 1,4% соответственно и у 2-х кроликов - 2,9% прослеживалось обильное отделяемое ( $\chi^2=95,51$ ; p=0,000). Наибольший удельный вес слабовыраженной степени гнойного отделяемого – в 7-ой группе у 8,6% (n=6), наименьший статистически значимый результат 1,4% (n=1) в 3-ей группе (p=0,000). В группах с лечением МКЛ и ГЛП на основе ПАК/МЦ одинаковое положение, так с умеренным уровнем гноя по 5 животных – 7,1%, слабовыраженным – 5,7% (n=4) и выраженный у 1,4% (n=1). Группа Pluronic F127 занимает 2 позиции: 12,9% (n=9) умеренновыраженной, 1,4% (n=1) выраженной.

Через 3 дня после начала лечения гнойной язвы роговицы анализ таблиц сопряженности показал следующие результаты: перемещение большего количества кроликов в сторону выраженного гнойного отделяемого составил самый больший процент из общего числа 55,7% (n=39), 27,1% (n=19) – умеренный и 2,9% (n=2) – слабовыраженный.  $\chi^2$  составил 92,020, что статистически значимо при p=0,001 согласно таблице распределения Пирсона. Группа патологии, лечения каплями и МКЛ-ми при этом имели самый больший удельный вес по 8 случаев в виде выраженного гнойного отделяемого, что составляет 11,4%. Из мукоадгезивных ЛФ в этой же категории только группа Pluronic имела меньшую разницу в более чем 7 раз (1,4% (n=1)). Отсутствие гноя имело место в группе контроля 14,3 % (n=10). В данной категории 27,1% принадлежало группам, где наблюдали умеренный тип гноя.

Динамика 7-го дня показала следующие результаты: большинство животных оказались в категории слабовыраженной степени гнойного

отделяемого – 41,4% (n=29) ( $\chi^2=120,32$ ;  $p=0,001$ ). Если в 4-ой группе отсутствовал гной, то в группе лечения каплями сохранился на уровне 10% (n=7). Предполагаемое по логике вещей присутствие гноя в группе патологии без лечения, подтверждается у 10% (n=7). На рисунке 20 мы видим смещение большего количества животных из умеренной степени в слабовыраженную: в группах Pluronic и МКЛ по 11,4% (n=8), ПАК/МЦ – 12,9% (n=9).

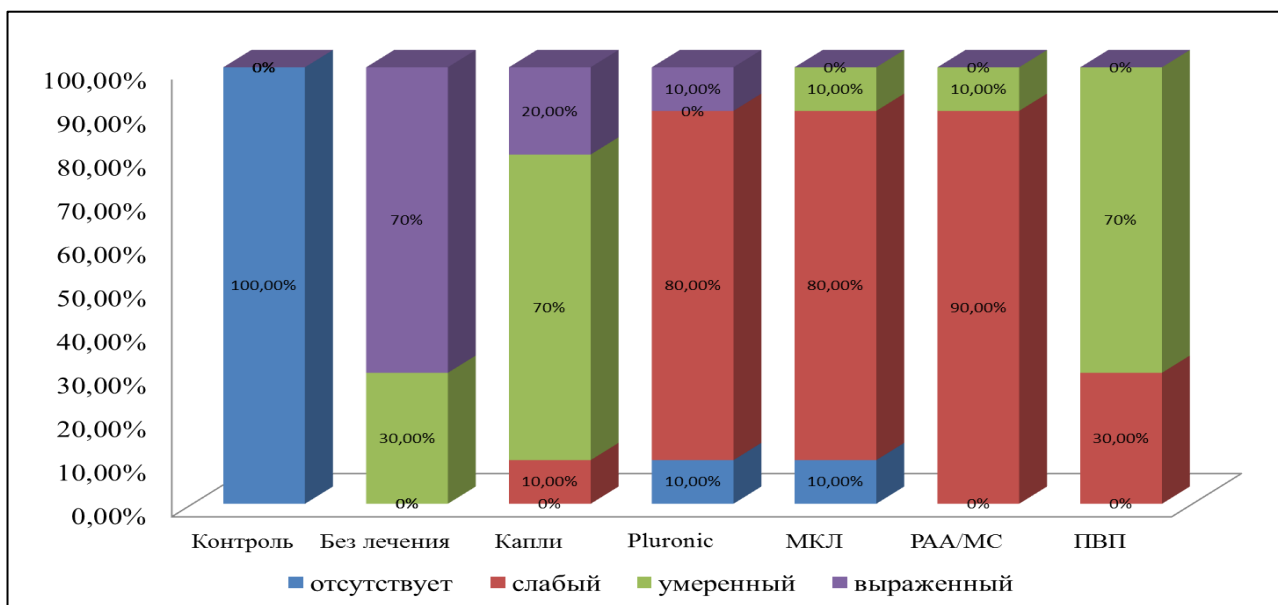


Рисунок 20 – Соотношение внутри экспериментальных групп различных степеней гнойного отделяемого на 7-ой день

По завершении лечения во всех группах на 10-ый день, расположение в итоговой ячейке по степеням гнойного отделяемого было следующим: в 72,9% (n=51) случаев гной отсутствовал ( $\chi^2=65,536$ ;  $p=0,001$ ). Но, несмотря на применение полного курса антибактериальной терапии умеренное 5,7% (n=4) и слабовыраженное 7,1% (n=5) отделяемое мы зафиксировали в группе лечения стандартными каплями «Ципролет». На рисунке 21 изображены категории гнойного отделяемого по степени их проявления и их соотношение к абсолютному значению в разных группах на 10-ый день. Так среди кроликов в 3-ой группе 25% (n=5) имели слабовыраженное гнойное отделяемое, 20% (n=4) слабовыраженное и только 1,4% (n=1) составил его отсутствие.

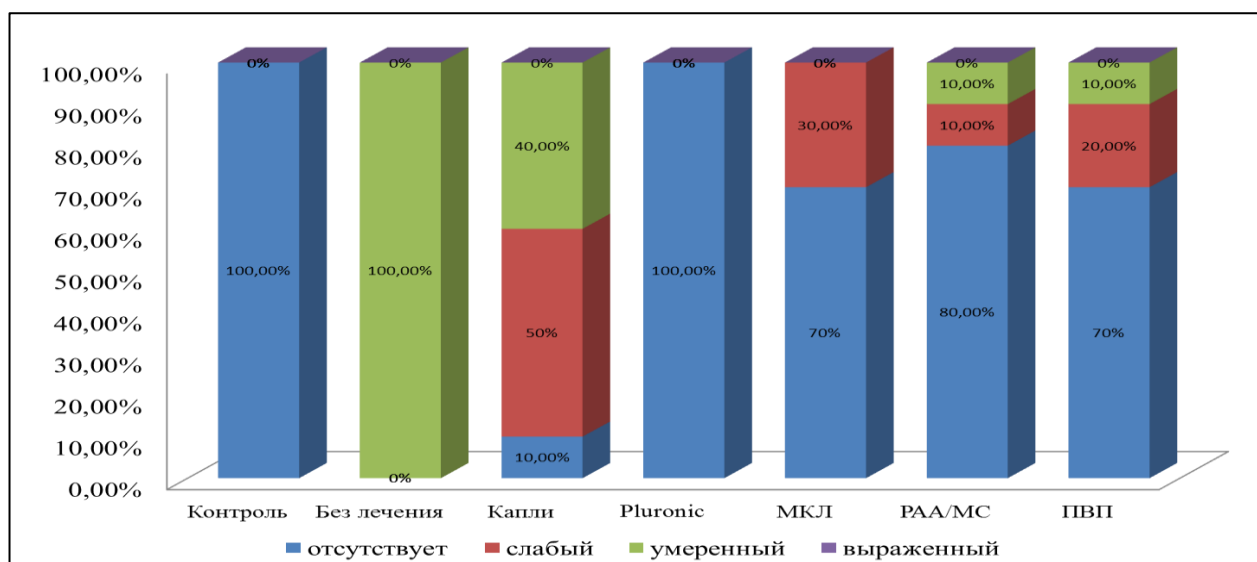


Рисунок 21 – Соотношение внутри экспериментальных групп различных степеней гнойного отделяемого на 10-ый день

Учитывая, что в эксперимент входили животные, которые были под наблюдением без патологии и без лечения, с патологией и без лечения, мы отдельно рассчитали лечебную ценность оставшихся 4 групп в сравнении с «золотым стандартом» лечения каплями Ципролет. В этих расчетах мы хотели выяснить, насколько достоверно значимо отличие в лечении мукоадгезивными глазными лекарственными формами в сравнении с каплями. Вследствии того, что ожидаемое число признака в ячейке составило менее 5, для сравнения результатов выбран точный критерий Фишера (таблица 31) [182]. Группа с лечением гелеобразующим раствором с ЦФ, имели статистически значимую разницу от 3-ей группы с лечением каплями при критерии Фишера равным 16,15 ( $p=0,001$ ). В тоже время при сравнении МКЛ с теми же каплями достоверность подтверждается в пользу последних ( $p=0,01$ ). Вторым по значимости выходит вперед ГЛП на основе ПАК/МЦ в сравнении с каплями ( $p=0,007$ ) с критерием Фишера=8,59. Несмотря на разницу на уровне критерии Фишера группа ГЛП на основе ПВП имела наименьшую разницу с 3-ей группой. Далее мы провели попарное сравнение в группах: МКЛ-ГЛП на основе ПВП, МКЛ-ПАК/МЦ, ПАК/МЦ-ПВП. По умолчанию группа Pluronic F127 не подлежала анализу, так как была единственной группой, в которой отсутствовал гной у всех кроликов. Сравнение других полимерных ГЛФ на 10-ый день статистически значимой разницы не выявило (таблица 31).

Таблица 31 – анализ сопряженности показателей гнойного отделяемого на 10-ый день

	Группы	«0»	«1»	«2»	Критерий Фишера, p
1	2	3	4	5	6
Гнойное отделяемое	Ципролет	5%, n=1	25%, n=5	20%, n=4	16,15 $p=0,001$

Продолжение таблицы 31

1	2	3	4	5	6
	Pluronic	50%, n=10	0%, n=0	0%, n=0	
Гнойное отделяемое	Ципролет	35%, n=7	15%, n=3	0%, n=0	8,59 p=0,01
	МКЛ	50%, n=10	0%, n=0	0%, n=0	
Гнойное отделяемое	Ципролет	5%, n=1	25%, n=5	20%, n=4	9,55 p=0,007
	ПАК/МЦ	50%, n=10	0%, n=0	0%, n=0	
Гнойное отделяемое	Ципролет	5%, n=1	25%, n=5	20%, n=4	7,24 p=0,02
	ПВП	35%, n=7	10%, n=2	5%, n=1	
Гнойное отделяемое	МКЛ	35%, n=7	15%, n=3	0%, n=0	1,21 p=1,000
	ПВП	35%, n=7	10%, n=2	5%, n=1	
Гнойное отделяемое	МКЛ	35%, n=7	15%, n=3	0%, n=0	1,94 p=0,582
	ПАК/МЦ	40%, n=8	5%, n=1	5%, n=1	
Гнойное отделяемое	ПАК/МЦ	40%, n=8	5%, n=1	5%, n=1	0,724 p=1,000
	ПВП	35%, n=7	10%, n=2	5%, n=1	

Таким образом, мы имели основание отвергать  $H_0$  гипотезу об отсутствии взаимосвязи между лечением гнойной язвы роговицы различными ГЛФ-ми и различным уровнем проявления гнойного отделяемого. Поэтому делаем вывод о том, что применение гелеобразующего раствора с ЦФ-ном на основе полимера Pluronic F127 ( $p=0,001$ ) в сравнении с другими ГЛФ-ми в 9 раз эффективнее, чем капли Ципролет, в 3 раза, чем ЛМКЛ и ГЛП на основе ПВП и в 2 раза эффективнее ГЛП на основе РАА/МС.

Критерий Фишера мы использовали для принятия или отклонения гипотезы о наличии отличий в качественном показателе – слезотечение из глаза между группами при лечении различными ГЛФ. Данный критерий, выявил статистически значимую разницу между группами, начиная с 1-го дня эксперимента и до его окончания, которые отражены в таблице 32.

Таблица 32 – Критерий  $\chi^2$  Пирсона показателей слезотечения в разные дни эксперимента

Дни	Кол-во кроликов	$\chi^2$ Пирсона	Критерий Фишера	p
1-ый	70	46,667 <sup>a</sup>	23,78	0,001
3-ий	70	28,255 <sup>a</sup>	29,88	0,001
7-ой	70	48,013 <sup>a</sup>	42,49	0,001
10-ый	70	40,243 <sup>a</sup>	31,15	0,001

Примечание: а. Для числа ячеек 7 (50,0%) предполагается значение, меньше 5. Минимальное предполагаемое число для 1-го дня =1,00, 3-го дня=4,43, 7-го дня=2,57, 10-го дня=1,86.

Изучение данного показателя выявило, что слезотечение в 1-ые сутки отсутствовало во всех группах, кроме животных без лечения,  $\chi^2$  Пирсона с

поправкой на уровне критерия Фишера составил 23,78 ( $p=0,001$ ). На 3 день картина значимо изменилась, хотя  $\chi^2$  Пирсона стал меньше более чем в 1,5 раза ( $p=0,001$ ). Выраженное слезотечение было отмечено у животных, которые находились без лечения и с лечением каплями ( $p=0,001$ ). Лечение другими полимерными ГЛФ предотвратило возникновение выраженного слезотечения ( $p=0,001$ ). На рисунке 22 видно, что значимая разница на 7-ой день эксперимента присутствует в группе без лечения и с лечением каплями ( $p=0,001$ ).

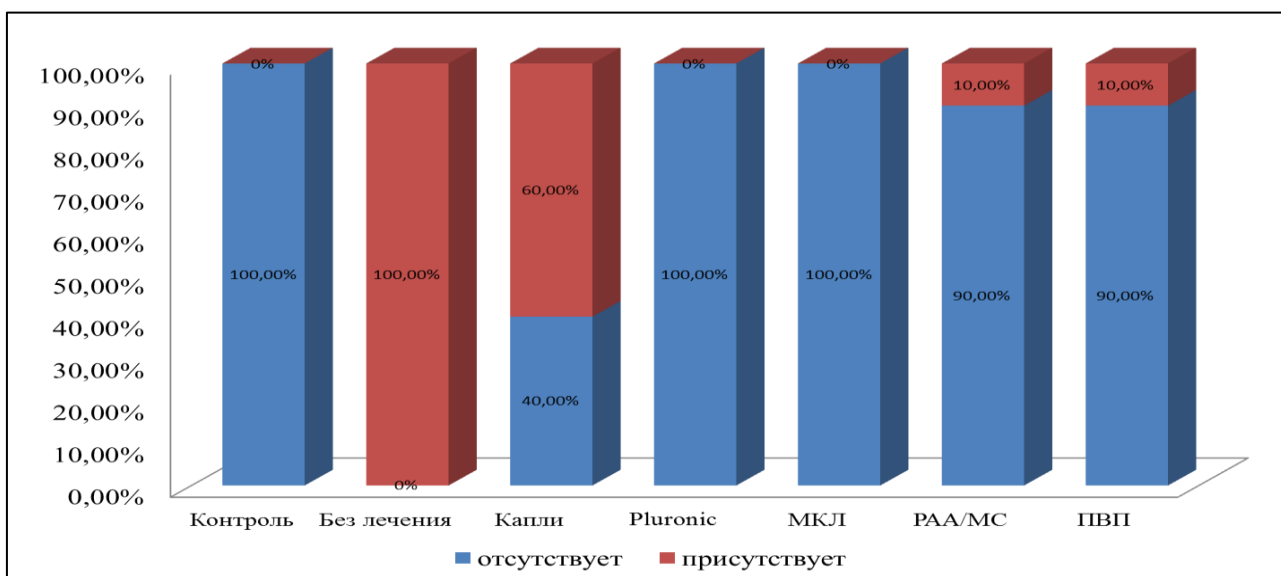


Рисунок 22 – Соотношение слезотечения из глаз внутри экспериментальных групп на 7-ой день

Следующий рисунок 23 представляет важные сведения об отсутствии или присутствии слезотечения на 10-ые сутки после лечения, для определения эффективности тех или иных глазных лекарственных форм. Так в группах, которые получали лечение гелеобразующим раствором на основе Pluronic и МКЛ, отсутствовало слезотечение ( $p=0,001$ ). По 1 кролику с наличием слезотечения на 10-ые сутки было отмечено в группах с лечением ГЛП на основе ПАК/МЦ и ПВП ( $p=0,001$ ). Стандартное лечение каплями не предотвратило полного исчезновения слезотечения, также, как и в группе кроликов без лечения в 5,7% и 10% случаев соответственно ( $p=0,001$ ).

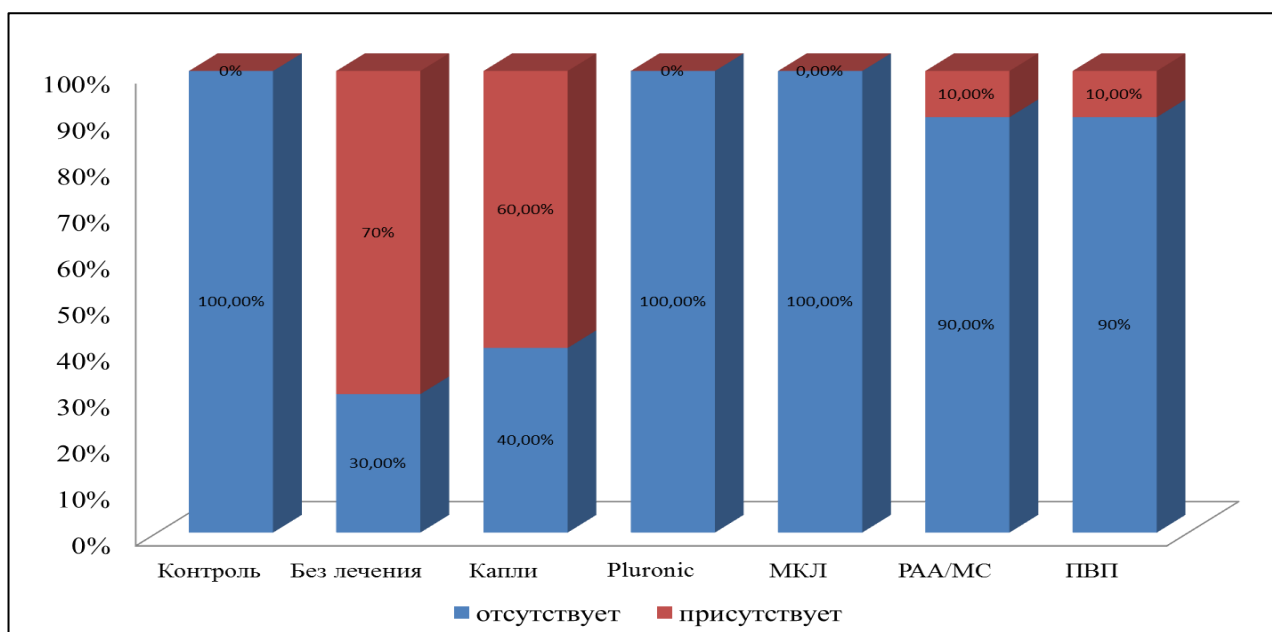


Рисунок 23 – Соотношение слезотечения из глаз внутри экспериментальных групп на 10-ый день

Проделанный анализ таблиц сопряженности слезотечения в подопытных группах выявило, что применение антимикробного препарата ЦФ показывает неполный бактерицидный эффект в группах с лечением каплями, ГЛП на основе ПАК/МЦ и ПВП ( $p=0,001$ ). Полимерный раствор Pluronic и ЛМКЛ оказали 100% лечебный эффект ( $p=0,001$ ).

Для выявления статистически значимой разницы в наличии отека между группами мы провели анализ таблиц сопряженности, где указали наличие или его отсутствие. Полученные данные показывают следующие результаты (таблица 33).

Таблица 33 – Критерий  $\chi^2$  Пирсона показателей отёка глаза в разные дни эксперимента

Дни	Кол-во кроликов	$\chi^2$ Пирсона	Критерий Фишера	p
1-ый	70	26,675 <sup>a</sup>	28,06	0,001
3-ий	70	34,735 <sup>a</sup>	34,08	0,001
7-ой	70	42,159 <sup>a</sup>	40,53	0,001
10-ый	70	30,800 <sup>a</sup>	21,72	0,001
Примечание: а. Для числа ячеек 7 (50,0%) предполагается значение, меньше 5. Минимальное предполагаемое число для 1-го дня=4,86, 3-го дня=3,14, 7-го дня=3,14, 10-го дня=1,43.				

Начиная с первого дня эксперимента отёк присутствовал во всех группах с лечением и без него: во второй и третьей группах по 12,9% (9), в 4-ой и 6-ой по 7,1% (5), 5-ой группе этот коэффициент составил 5,7% (4), 7-ая группа содержала меньше всего кроликов с отеком – у 2,9% (2)  $p=0,001$ ). Уже на 3-ий день с начала лечения количество кроликов с отёком увеличилось на 10% при

лечении ГЛП на основе ПВП ( $p=0,001$ ); на 4,3% в группе с лечением МКЛ-ми ( $p=0,001$ ); на 2,9% при лечении ГЛП на основе ПАК/МЦ ( $p=0,001$ ); на 1,4% в группах без лечения и с лечением каплями ( $p=0,001$ ). Одна группа с лечением Pluronic F127 осталась без изменений и сохранила тот же уровень 7,1% (5) ( $p=0,001$ ). Динамика на 7-ой день была отличной от третьего дня наблюдений, так в 4-ой группе отек отсутствовал у всех животных ( $p=0,001$ ), в 5-ой и 6-ой группах мы наблюдали отек у 1 кролика (1,4%;  $p=0,001$ ). Если в 7-ой группе наблюдался отёк у 3-х животных (4,3%), то в 3-ей у 10% (7) животных.

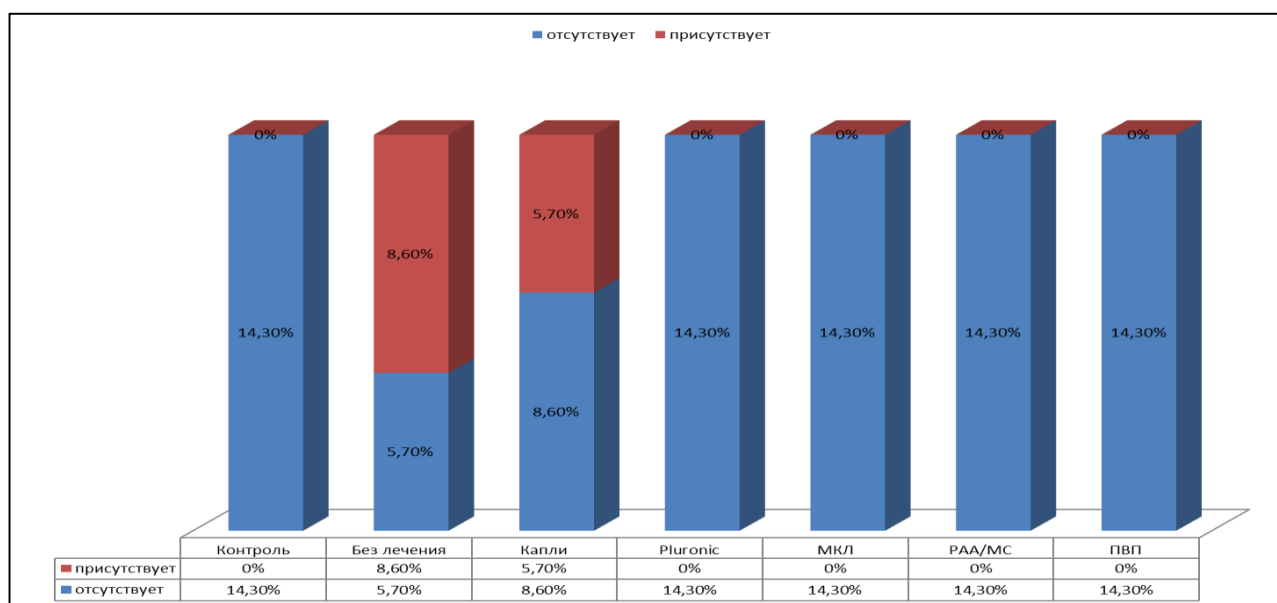


Рисунок 24 – Соотношение отёка глаз внутри экспериментальных групп на 10-ый день

Рисунок 24 наглядно отражает опровержение гипотезы об отсутствии взаимосвязи между наличием отёка глаза и методом лечения при гнойной язве роговицы. На 10-ый день только 3-ья группа с применением капель в 5,7% (4) достоверно отличается от мукоадгезивных ГЛФ ( $p=0,001$ ). Если кролики без лечения имели в 8,6% наличие отёка, то от последних они отличались в 2,9% (2) случаев при  $p=0,001$ .

Таким образом, мукоадгезивные полимеры в качестве основы ГЛФ для лечения глазной патологии, сопровождающиеся отеком, являются в 2 раза эффективнее, чем стандартные капли, применяемые 4 раза в течении суток.

Самым грозным осложнением травм глаза, который приводит к слепоте, является образование бельма на роговице [183,184]. Чтобы оценить соотношение между образованием бельма на роговице и лечением различными ГЛФ с ЦФ-ном, нами было проведено сравнение распространенности бельма у кроликов с лечением каплями, гелеобразующим раствором на основе Pluronic F127, ЛМКЛ, ГЛП на основе ПАК/МЦ, ПВП и без лечения с использованием критерия  $\chi^2$  Пирсона. Группу контроля по умолчанию мы исключили из данного анализа, так как животные этой группы не подвергались травме,



соответственно там не может быть вышеупомянутого осложнения. Статистика в данном анализе критерия  $\chi^2$  Пирсона= 22,500 при  $p=0,001$ , на основании чего мы имели убедительное подтверждение значимого, реального различия в частоте образования бельма на глазу в зависимости от применяемого вида ГЛФ. Так, на рисунке 25 изображены результаты 60 кроликов, получавших лечение по поводу гнойной язвы роговицы, которые были распределены в следующем соотношении: удельный вес кроликов с бельмом на глазу по 16,7% ( $n=10$ ) ( $p=0,001$ ) случаев прослеживается в группах без лечения и с лечением каплями Ципролет 0,3%. В 2 раза меньше животных с этим же осложнением в 8,3% ( $n=5$ ) зафиксирован после лечения МКЛ и ГЛП на основе ПВП ( $p=0,001$ ). На 1,4% меньше последних мы отметили в группе с лечением ГЛП на основе ПАК/МЦ, который соответствовал 6,7% ( $n=4$ ) ( $p=0,001$ ). Только единственная 4-ая группа обладала наилучшим результатом в 3,3% ( $n=2$ ) ( $p=0,001$ ).

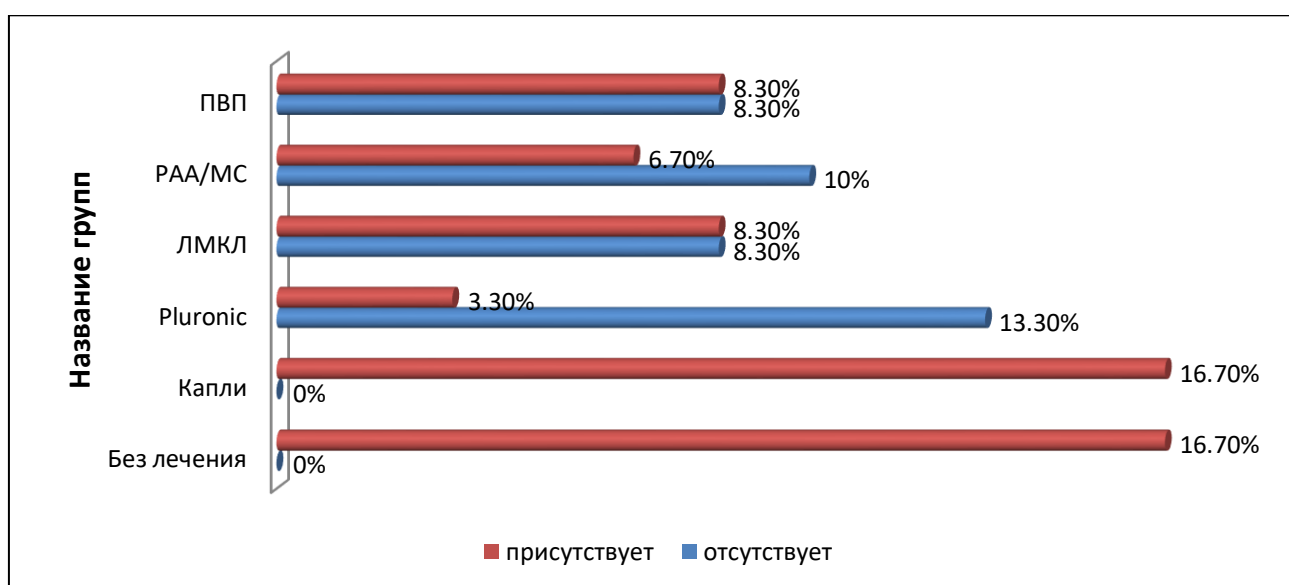


Рисунок 25 – Соотношение бельма на глазу внутри экспериментальных групп на 10-ый день

Резюмируя результаты данного этапа исследования, мы получаем следующее: на основании температурных показателей, уровня стафилококка в глазах, качественных данных клинических симптомов, имеются основания для того, чтобы достоверно утверждать о наличии взаимосвязи между эффективностью лечения гнойной язвы роговицы и видом ГЛФ-мы, содержащими фторхинолоновый антибиотик. Pluronic F127 как полимер для основы глазной лекарственной формы с ЦФ-ном является самым эффективным, который предотвращает вероятное образование бельма на глазу.

### 3.5 Результаты хроматографического анализа распределения ципрофлоксацина в роговице

В третьей серии экспериментов исследование было проведено на 30 половозрелых кроликах породы Шиншилла, распределение по группам

составило по 6 животных для одного вида ГЛФ. Кроликам 1-ой группы закапывали 0,3% раствор Ципролета. Во 2-ой группе закапывали гелеобразующий раствор на основе Pluronic F127, содержащего ЦФ. Животным 3-ей группы в конъюнктивальную полость закладывали ГЛП на основе ПАК/МЦ. В 4-ой группе применяли ГЛП на основе ПВП (коммерческие) с ЦФ-ном. Животным 5-ой группы накладывали ЛМКЛ, содержащих ЦФ.

Калибровочная кривая ЦФ-на была приготовлена путем растворения 3000 mg лекарства в 3000 mg сверхчистой дистиллированной воды ( $1 \text{ mg } 1 \text{ mL}^{-1}$ ). Далее из данного стандарта приготовили серию растворов в разведении между 100 и  $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$  (рис 26).

Концентрация $\mu\text{g/mL}$	Площадь под кривой
100.00	361.43
50.00	173.62
25.00	85.53
12.50	42.45
6.25	20.85
3.13	9.82
1.56	4.52
0.78	2.25
0.39	1.26
0.20	0.66
0.10	0.41

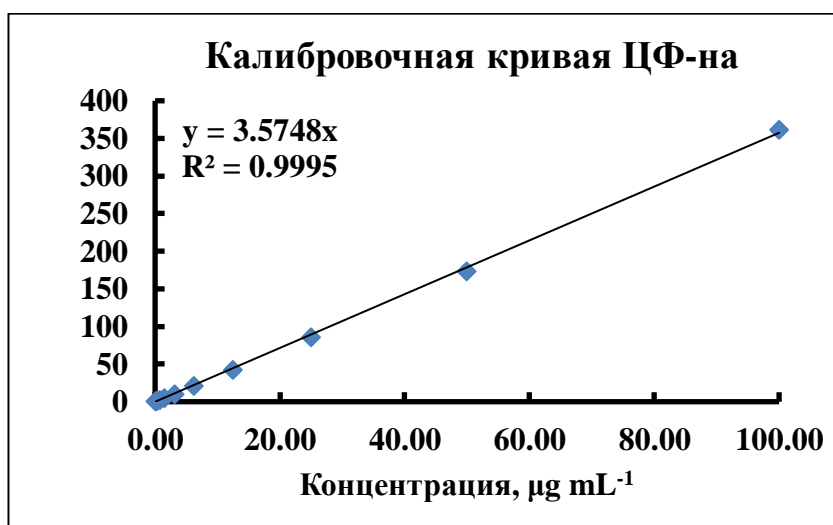


Рис 26 – График построения калибровочной кривой ципрофлоксацина для ВЭЖХ

Сравнение концентраций пяти ГЛФ, содержащих ЦФ-н в роговице глаза через 30 минут с момента наложения показало, что в 1-ой группе животных, которым закапывали капли, средняя концентрация антибиотика составила  $1,58 \text{ мкг/мл}$ , что в 5 раз статистически значимо ниже, чем в группе с применением ГЛФ-мы на основе полимера Pluronic F127 ( $\text{Me}=7,91 \text{ мкг/мл}$ ,  $p=0,001$ ). В сравнении с 4-ой и 5-ой группами эта разница составила в 3 раза, что также статистически значимо  $\text{Me}=4,0 \text{ мкг/мл}$  и  $4,82 \text{ мкг/мл}$  соответственно ( $p=0,001$ ). На втором месте по уровню концентрации ЦФ-на в роговице находится 3 группа ( $\text{Me}=5,57 \text{ мкг/мл}$ ,  $p=0,001$ ). В данной части эксперимента объем выборки составил менее  $n=15$ , распределение считаем ненормальным. Поэтому мы взяли за основу наблюдаемое неравенство дисперсий со степенями свободы=4, критерий Ливиния на уровне=0,391 ( $p=0,05$ ) и использовали апостериорный анализ с поправкой Бонферони=0,01 (таблица 34). Статистически значимые отличия в сравнении с другими группами зафиксированы в 1-ой группе ( $p=0,001$ ). На основании апостериорного анализа достоверно утверждение, что применение ГЛП на основе ПАК/МЦ и ЛМКЛ-зы создают более высокую концентрацию ЦФ-на, чем ГЛП-ки на основе ПВП-на

( $p=0,001$ ), но меньшую концентрацию, чем *in situ gel Pluronic F127* ( $p=0,001$ ) (таблица 34).

Через 60 минут картина концентрации ЦФ-на отлична от 30 минут, что статистически значимо ( $p=0,001$ ). Если количество участвующих кроликов одинаково, то распределение также считается ненормальным. Наименьшая средняя концентрация антибиотика наблюдалась в 1-ой группе 1,28 мкг/мл, что на 0,3 мкг/мл меньше, чем через 30 минут с момента инстилляций и в 5,9 раз меньше, чем во 2-ой группе ( $Me=7,56$  мкг/мл,  $p=0,001$ ). Мы сравнивали все группы с каплями, поэтому по убыванию 2 место заняла группа ГЛП-ок на основе ПАК/МЦ, что в 4 раза больше ( $Me=5,23$  мкг/мл,  $p=0,001$ ). Несмотря на более длительную экспозицию ЛМКЛ концентрация ЦФ-на была меньше, чем во 2-ой и 3-ей группах ( $p=0,001$ ), но больше, чем при применении ГЛП на основе ПВП ( $Me=3,73$ ,  $p=0,001$ ) (таблица 34). Неравенство дисперсий при статистике Ливиня=0,601 ( $p=0,05$ ) послужило основанием для проведения робастных тестов с применением критериев Уэлча=144,047 ( $p=0,001$ ) и Брауна-Форсайта=157,282 ( $p=0,001$ ). В таблице 34 отражена статистически значимая разница в 1-ой группе в сравнении со всеми остальными ( $p=0,001$ ). Статистически значимые результаты 60 минут после применения различных ГЛФ показали: проникновение в роговицу глаз кроликов ЦФ-на в 3-ей группе с ГЛП-ок на основе ПАК/МЦ создали наибольшую концентрацию, чем с использованием ЛМКЛ и ГЛП на основе ПВП, но меньшую концентрацию, чем *in situ gel Pluronic F127* ( $p=0,001$ ).

Таблица 34 – ANOVA и Апостериорное исследование концентрации ЦФ-на в роговице

Время, мин	Группа	N	Среднее	SD	Станд ошибка	95 % ДИ		Критерий F, внутри групп	Критерий F, между группами	p
						НГ	ВГ			
30	Ципролет	3(6 глаз)	1,58	0,20	0,11	1,39	1,78	170,348	157,282	0,001
	Pluronic	3(6 глаз)	7,91	0,44	0,25	7,47	8,35			
	ПАК/МЦ	3(6 глаз)	5,57	0,32	0,18	5,27	5,90			
	ПВП	3(6 глаз)	4,00	0,24	0,14	3,74	4,22			
	ЛМКЛ	3(6 глаз)	4,82	0,28	0,16	4,56	5,11			
60	Ципролет	3(6 глаз)	1,28	0,19	0,11	1,12	1,49	170,348	157,282	0,001
	Pluronic	3(6 глаз)	7,57	0,43	0,25	7,21	8,04			
	ПАК/МЦ	3(6 глаз)	5,24	0,32	0,19	4,90	5,54			
	ПВП	3(6 глаз)	3,73	0,30	0,17	3,39	3,96			
	ЛМКЛ	3(6 глаз)	4,52	0,29	0,17	4,25	4,83			
Апостериорное сравнение концентраций ЦФ-на 30 минут										
Группы	Сравниваемые группы, J	Разность средних, I-J	Стандартная ошибка	95% ДИ		p				
				НГ	ВГ					
Ципролет	Pluronic	-6,323*	0,250	-7,22	-5,43	0,001				
	ПАК/МЦ	-3,983*	0,250	-4,88	-3,09	0,001				
	ПВП	-2,420*	0,250	-3,31	-1,53	0,001				
	ЛМКЛ	-3,240*	0,250	-4,13	-2,35	0,001				
ПАК/МЦ	Pluronic	-2,340*	0,250	-3,23	-1,45	0,001				
ПВП	Pluronic	-3,903*	0,250	-4,80	-3,01	0,001				
	ПАК/МЦ	-1,563*	0,250	-2,46	-0,67	0,001				
	ЛМКЛ	-0,820*	0,250	-1,71	-0,07	0,001				
ЛКМЛ	Pluronic	0,972	0,250	0,411	1,532	0,001				
	ПАК/МЦ	0,898	0,250	0,040	1,755	0,001				
Апостериорное сравнение концентраций ЦФ-на 60 минут										
Ципролет	Pluronic	-6,280*	0,258	-7,20	-5,36	0,001				
	ПАК/МЦ	-3,950*	0,258	-4,87	-3,03	0,001				
	ПВП	-2,446*	0,258	-3,37	-1,52	0,001				

Продолжение таблицы 34

1	2	3	4	5	6	7
	ЛМКЛ	-3,236*	0,258	-4,16	-2,31	0,001
ПАК/МЦ	Pluronic	-2,340*	0,258	-3,25	-1,41	0,001
ПВП	Pluronic	-3,903*	0,258	-4,76	-2,91	0,001
	ПАК/МЦ	-1,563*	0,258	-2,43	-0,58	0,001
	ЛМКЛ	-0,820*	0,258	-1,71	0,13	0,001
ЛМКЛ	Ципролет	3,237*	0,258	2,31	4,16	0,001
	Pluronic	3,033*	0,258	-3,97	-2,12	0,001
*Средняя разность значима на уровне Бонферони 0,01						

Данные количественной оценки состояния уровня концентрации ЦФ-на в роговице глаз кроликов представлены на рисунке 27. Мы имели 2 зарегистрированных уровня антибиотика через 30 и 60 минут во всех исследуемых группах. Как видно из рисунка, наибольший пик соответствует 2-ой группе – применение гелеобразующего раствора Pluronic F127, наименьший уровень наблюдался в 1-ой группе – капли «Ципролет 0,3%». Мукоадгезивные свойства полимеров с наибольшим временем экспозиции также занимают высокие позиции в более, чем в 3 раза ( $p=0,001$ ).

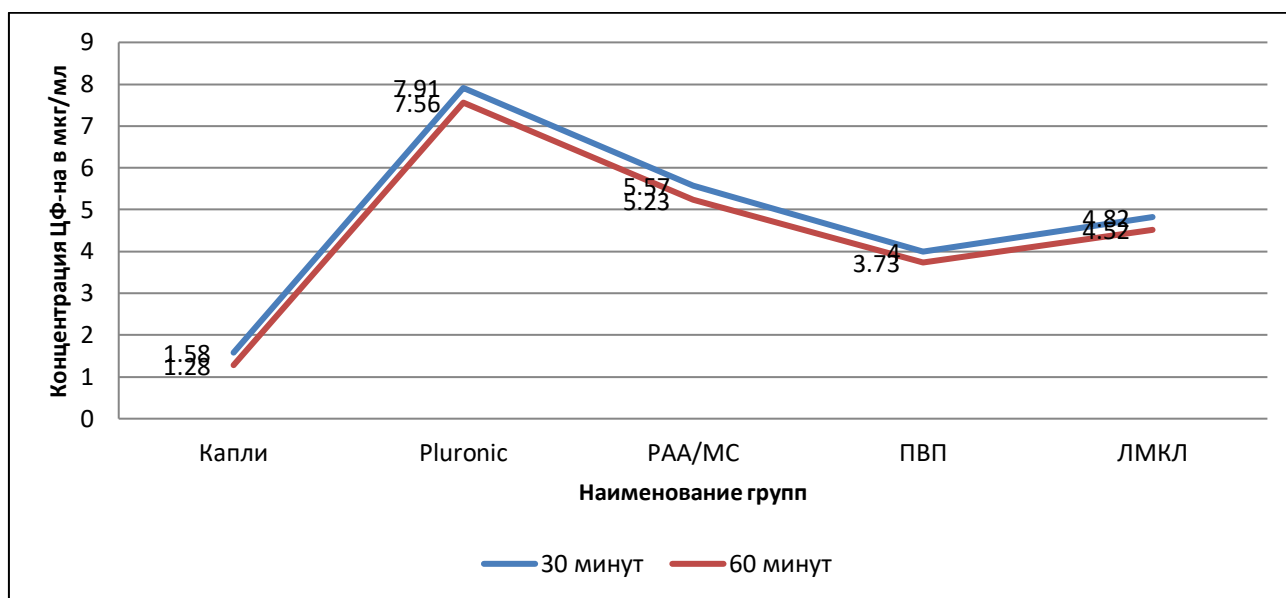


Рисунок 27 – Изменение концентрации ЦФ-на в экспериментальных группах в зависимости от времени, прошедшего с момента инстилляций на роговицу

Из вышеизложенного материала следует, что полимеры с мукоадгезивными свойствами обладают лучшим десорбирующим свойством, чем стандартные глазные капли. С течением времени биодоступность антибиотика изменяется в большинстве случаев в одинаковой пропорции во всех группах, что подтверждает гипотезу о наличии статистически значимой разницы при выборе ГЛФ-мы с одним и тем же лекарственным препаратом.

### 3.6 Результаты морфологического исследования роговицы глаз кроликов

Энуклеированные роговицы глаз кроликов контрольной и экспериментальных групп были обычного макроскопического строения, различия наблюдались при морфологическом исследовании.

1 экспериментальная группа - без патологии и без лечения 10-ые сутки

В исследуемых стеклопрепаратах роговица с сохранением целостности всех слоев, ее поверхность покрыта многослойным плоским эпителием, под которым отмечается боуменова борозда. Строма состоит из упорядоченных коллагеновых волокон, между которыми располагаются единичные

фибробласты с хорошо окрашенными ядрами. Задняя поверхность роговицы выстлана однослойным плоским эпителием (рис 28).

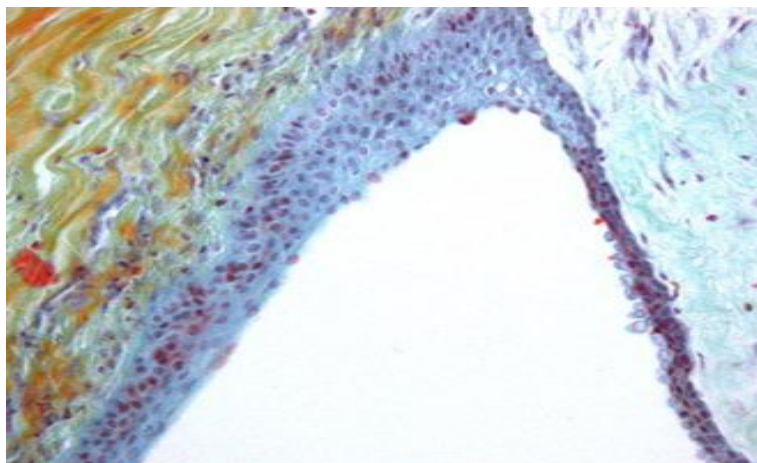


Рисунок 28 – Участок роговицы выстлан полигональными клетками, базальная мембрана четкая. Окраска Трихром по Массону. Увеличение x100

2 экспериментальная группа – с патологией и без лечения 10-ые сутки

На гистологических препаратах признаки гнойного воспаления с расплавлением тканей роговицы, скопление экссудата в передней камере. Собственный слой роговицы некротизирован и инфильтрирован до 1/3 толщины нейтрофилами. В отдельных участках на периферии, где в собственном слое, имелось разрастание грануляционной ткани, на поверхности имелись небольшие островки эпителизации.

3 экспериментальная группа – с патологией и с лечением глазными лекарственными каплями «Ципролет»-0,3% на 10-ые сутки

На стеклопрепаратах тканей роговицы признаки некротических изменений, в единичных случаях признаки регенерации, отмечается слабая пролиферация гистиоцитов с признаками с признаками гнойного воспаления. Местами участки сращения с радужной оболочкой, в которой были очаги гнойного воспаления.

4 экспериментальная группа – с патологией и с лечением гелеобразующим раствором на основе Pluronic F127

На гистологических препаратах данной группы имело место выраженная активная регенерация эпителия, который покрывал роговицу на большом протяжении и состоял в основном из 3-х или 4-х слоёв. В периферических отделах отмечалась эозинофильная инфильтрация, единичная пролиферация молодых клеток, которая имела многослойное строение, и наконец, в базальном слое были элементы митоза.

5 экспериментальная группа – с патологией и с лечением ЛМКЛ с ЦФ-ном

Гистологические препараты на 10-е сутки - в центральной части роговицы имелась небольшая зона некроза, но в периферических отделах отмечалась регенерация эпителия в виде пласта на незначительном протяжении,

состоящего из 2-х слоёв клеток, плавно переходящий в эпителий обычного строения.

6 экспериментальная группа – с патологией и с лечением ГЛП на основе ПАК/МЦ

В центре роговицы прослеживался некротически измененный собственный слой. Ближе к периферии на гистопрепаратах имелись множественные тонкие пласты регенерирующего эпителия, под которым в единичных местах собственно слой оказывался некротически измененным. Также имелись участки, где собственно ткань роговицы имела нормальное строение и наблюдалась лишь усиленная пролиферация клеток фибропластического ряда.

7 экспериментальная группа – с патологией и с лечением ГЛП на основе поливинилпирролидона

Во всех слоях зафиксированы регенераторные процессы при сохраненной единичной некротизации в центре роговицы. Роговица по большей площади была выстлана активно пролиферирующим многослойным плоским неороговевающим эпителием. Среди клеток неороговевающего эпителия многочисленные фигуры митоза. Нейтрофильная инфильтрация прослеживается в субэпителиальных клетках собственного слоя.

Как видно из рисунка 29, определение площади дефекта собственно роговицы имеет разницу в диапазоне от  $6,19 \pm 0,23 \text{ мм}^2$  до  $26,14 \pm 0,95 \text{ мм}^2$ . Полученные данные в экспериментальных группах сравнивались с группой патологии и без лечения, в которой этот дефект составил  $26,14 \text{ мм}^2$ . При лечении стандартными каплями это значение было на 40,05% меньше, что подтверждает положительную динамику лечения антимикробными препаратами ( $p \leq 0,002$ ). Результат эффективности применения мукоадгезивных лекарственных форм подтверждается статистически значимыми данными: в группе с лечением гелеобразующим раствором на основе Pluronic F127 площадь поражения составляет  $6,19 \text{ мм}^2$  (23,69%), что в 4 раза меньше, чем во 2-ой группе. В группе с лечением глазными лекарственными пленками на основе полиакриловой кислоты с метилцеллюлозой и поливинилпирролидона площадь дефекта была на уровне  $8,68 \text{ мм}^2$  (33,21%) и  $9,36 \text{ мм}^2$  (35,81%) соответственно, что в 3 раза меньше, чем во 2-ой. В группе с применением ЛМКЛ, содержащими ципрофлоксацин, дефект роговицы отличался от сравниваемой группы и был меньше  $10,8 \text{ мм}^2$  (41,32%), что в 2,3 раза меньше, чем во 2-ой группе.



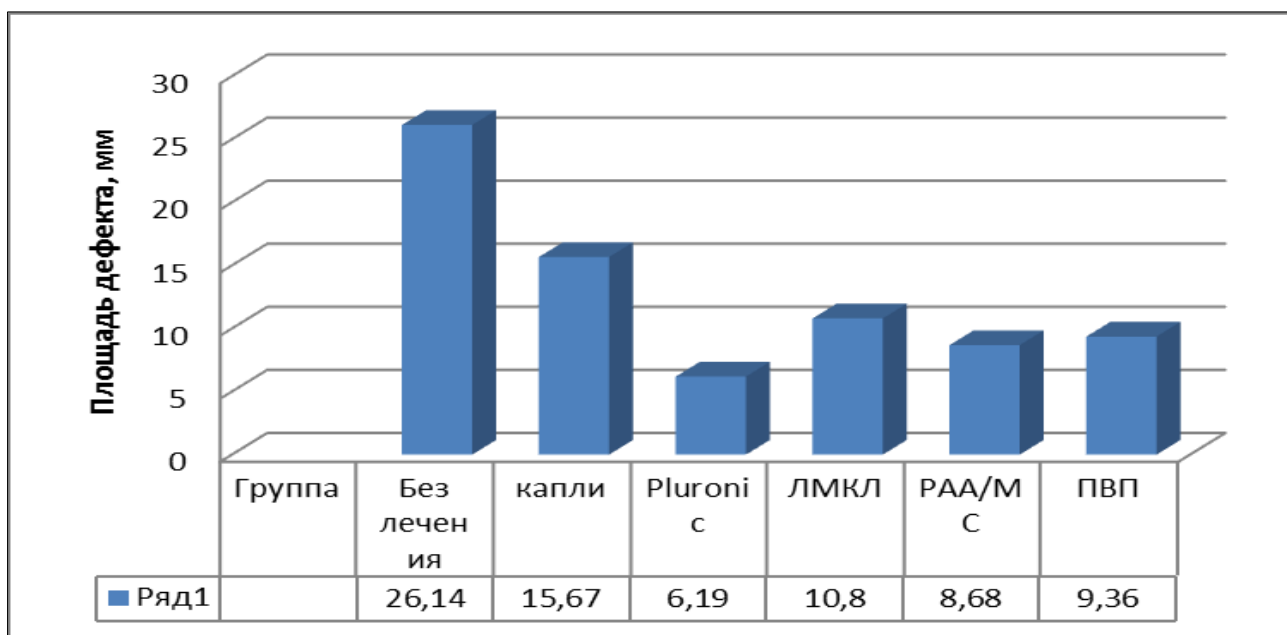


Рисунок 29 – Площади дефекта эпителия роговицы в исследуемых группах в зависимости от применяемого лечения

Таким образом, на основании проведенного анализа гистологических исследований, можно сделать вывод, что наибольшая пролиферативные процессы, эпителизация всех слоёв роговицы наблюдается при использовании мукоадгезивной глазной лекарственной формы на основе Pluronic F127 и подтверждает эффективность при лечении экспериментальной гнойной язвы. Использование стандартных капель вызывает умеренные пролиферативные процессы и не предотвращает развитие некробиотических, дистрофических изменений в тканях роговицы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лечение и профилактика инфекционно-воспалительных заболеваний роговицы представляет собой серьёзную медико-социальную проблему. На сегодняшний день доставка глазных лекарств остаётся до конца неизученной, так как фармакокинетика этих препаратов также не раскрыта полностью. Несмотря на успешное развитие офтальмотерапии, вопрос о выборе глазной лекарственной формы остаётся дискуссионным и открытым.

Большой процент осложнений воспалительных патологий глаза, в том числе развивающихся после травм различной этиологии, большая частота развития дефекта роговицы в виде бельма, и как следствие разочарованность врача и неудовлетворенность пациента исходом лечения, диктуют необходимость разработки новых мукоадгезивных глазных лекарственных форм, позволяющих повысить эффективность лечения и биодоступность в биологических тканях глаза с данными патологиями. Поэтому изучение антибактериального эффекта с мукоадгезивных глазных лекарственных форм на основе полимеров неионной природы Pluronic F127, поли(акриловой кислоты) и метилцеллюлозы в условиях экспериментальной гнойной язвы роговицы является актуальной попыткой решения данной проблемы.

В обзоре литературы освещены вопросы о причинах возникновения воспалительных патологий глаза, частоту встречаемости в структуре общей заболеваемости, описали применяемые глазные лекарственные формы, на основе различных полимеров, недостатки стандартного лечения каплями, представили современные данные о лечении болезней переднего сегмента глаза и проведенные исследования, которые ждут дальнейшего продолжения изучения в клинике. Основываясь на данные мировой литературы, мы пришли к выводу о сложности и многогранности механизмов низкой биодоступности вследствие быстрой вымываемости с поверхности глаз и конъюнктивы. По-прежнему существует целый ряд нерешённых вопросов, отрицательно влияющих на удерживаемость в глазу лекарства, что обуславливает необходимость дальнейших исследований и поиска новых мукоадгезивных глазных лекарственных форм, основываясь на эффективности лечения.

Разработка новых мукоадгезивных форм на основе полимеров, обладающих свойством образовывать гель и медленно высвобождающих антибактериальный препарат в роговичную ткань для лечения воспалительных патологий, а также исследование их безопасности и эффективности в эксперименте *in vivo* являются актуальными вопросами офтальмофармакологии на сегодняшний день.

Имеющиеся литературные данные свидетельствуют о значительных перспективах применения Pluronic F127, поли(акриловой) кислоты и метилцеллюлозы в офтальмотерапии при лечении гнойно-воспалительных заболеваний и конструировании новых мукоадгезивных глазных лекарственных форм с пролонгированным и контролируемым лечебным действием с использованием этих полимеров.

Все вышеперечисленное послужило основанием для проведения данного эксперимента.

Новые разработанные ГЛП на основе ПАК/МЦ в пропорции 30-70 вес % и гелеобразующие растворы на основе полимера Pluronic F127 в ходе исследования экспериментов *in vivo* соответствуют стандартам глазных лекарственных форм. По форме, эластичности, способности к мукоадгезии и впитыванию необходимой концентрации лекарственного вещества показали положительный результат, что соответствовало глазным каплям 0,03 % Ципрлета. На основании полученных результатов изученные ГЛФ могут быть рекомендованы как альтернативный подход для лечения патологии роговицы, так как содержит необходимую концентрацию антимикробного препарата и способно прикрепляться к поверхности роговицы с образованием геля.

Изучение удерживаемости глазных лекарственных пленок на основе ПАК/МЦ имеет различное время экспозиции. Время удерживания рибофлавина зависело от химического состава. Пленка на основе 100% МЦ удерживалась в течении 50 минут, но возникали сложности при наложении, недостаточная адгезивность приводила к периодическим «отлипаниям». Плёнка с 100% содержанием ПАК напротив была слишком адгезивной, прилипала не только к поверхности роговицы, но и к верхнему веку, создавая значительные трудности. Смешение полимеров ПАК/МЦ в пропорции 50/50, 70/30 и 30/70 позволило получить материалы с оптимальными свойствами благодаря хорошей пленкообразующей способности и медленному растворению МЦ, и высокой способности ПАК к мукоадгезии. Полимер неионной природы, использованный в этой же серии экспериментов, известный как Pluronic F127 и F68 показал различное время удерживания и различную концентрацию в слёзной жидкости, изученную спектрофотометрическим методом. Pluronic F127 обладает лучшей адгезивной (в течение 50 минут) и гелеобразующей способностью в противовес Pluronic F68 (в течении 15 минут). Концентрация флюоресцеина в слезной жидкости доказала полученный результат, так как через 15 минут в группе, которым закапывался раствор Pluronic F68, его уровень был приближенным к нулю. Установлено, что ГЛП на основе ПАК/МЦ в пропорции 30/70% обладает наибольшим временем удерживания на поверхности глаз и достаточно медленным растворением –40-50 минут. Раствор на основе Pluronic F127 обладает наилучшей гелеобразующей способностью. Изученные мукоадгезивные глазные формы на основе полимеров не вызывают побочных эффектов. Согласно поставленным задачам для реализации данного этапа работы, результаты исследования подтвердили наилучшее время экспозиции глазных лекарственных пленок на основе ПАК/МЦ в пропорции 30/70% и гелеобразующих растворов на основе полимера Pluronic F127, давшее предпосылку для дальнейшего экспериментального исследования.

В результате изучения переносимости вышеизученных новых ГЛП на основе ПАК/МЦ, гелеобразующих растворов на основе Pluronic F127 и ЛМКЛ, содержащих ципрофлоксацин в течении 30 дней (9 особей) было установлено отсутствие влияния на общее состояние животных, характер поведения,

внешний вид, вес и температуру тела. Сравнительное патоморфологическое исследование структур глаза не обнаружило патологических изменений.

Развитие гнойной язвы роговицы в экспериментальных группах имела различную картину на протяжении 10 дней наблюдения. Так через сутки в 100% случаев развивалась язва, но с различным уровнем КОЕ в глазах. Отсутствие лечения и применение стандартных глазных капель сохраняло смешанную, и в тоже время выраженную клинику на протяжении всех 10 дней наблюдения в виде гноя, отека, гиперемии. ГЛП на основе полимеров снизили образование осложненных дефектов роговицы в виде бельма на 40-50%. Единственный положительный результат в динамике течения гнойной язвы, который на 80% предотвратил не только формирование дефекта, но и уменьшение всех клинических симптомов, мы наблюдали при использовании ципрофлоксацина в виде гелеобразующего раствора на основе Pluronic F127.

Анализ температурных данных во всех экспериментальных группах показал, что разница наблюдалась с 1-го дня применения лечения. Pluronic F127 с гелеобразующей способностью показал эффективность начиная со 2-ых суток. Тогда как в других группах с применением ГЛП на основе ПВП, ПАК/МЦ и ЛМКЛ этот уровень сместился на 2 дня в группе, на 3 дня с лечением каплями и стойкая температура на одном уровне без резких подъёмов, но повышенная в пределах 1 градуса была отмечена у кроликов без лечения.

Похожая клиническая картина наблюдалась и в результатах уровня стафлюкокка (КОЕ). Пик на 2-ые сутки был отмечен соответственно в группе с Pluronic F127. ГЛП на основе ПАК/МЦ, ПВП и ЛМКЛ аналогично уступали 2-ой группе, и пик приходился на 3-4 сутки. У животных без лечения пик уровня КОЕ зарегистрирован на 5-ые сутки без тенденции к резкому снижению. Стандартное лечение каплями изменяло, уровни КОЕ без тенденции к резкому увеличению и резкому спаду, но плавное снижение наблюдали, начиная с 6-го дня.

Клиническая картина гнойной язвы роговицы регистрировалась отсутствием или присутствием гиперемии, визуального присутствия гнойного отделяемого, слезотечения и отека.  $\chi^2$  Пирсона доказал статистически значимое влияние применяемой ГЛФ на течение клиники экспериментальной гнойной язвы роговицы. Умеренная гиперемия на момент окончания антибактериального лечения была в 2-х группах: без лечения и с лечением стандартными каплями, слабый уровень в 7-ой с ГЛП на основе ПВП, краевая или слабая в 10% случаев в 4-ой с Pluronic F127 и 5-ой с ЛМКЛ. Единственный наилучший результат- 100% отсутствия гиперемии был в 6-ой группе с лечением ГЛП на основе ПАК/МЦ. Полное отсутствие слезотечения на 10 день эксперимента наблюдали при лечении Pluronic F127 и ЛМКЛ. И только в 10% сохранилось при лечении ГЛП на основе ПАК/МЦ и ПВП. Схожая картина с сохранением слезотечения на конец эксперимента, как следствие низкой биодоступности ципрофлоксацина или его полное отсутствие, мы отметили во 2-ой и 3-ей группах. Отличительная картина была в динамике отёка слизистой

глаз на протяжении всех 10-ти дней эксперимента. Высокую эффективность при изучении данного критерия клинического течения язвы мы наблюдали при использовании всех мукоадгезивных глазных лекарственных форм. И наконец, самым важным критерием оценки эффективности лечения гнойной язвы роговицы, является развитие осложнения в виде дефекта (бельмо на глазу) различной по площади и глубине. Гелеобразующий раствор на основе Pluronic F127 на 80% предотвратил формирование бельма.

Проведенный морфологический анализ экспериментального материала показал, что выраженные пролиферативные изменения и эпителизация роговичной ткани с наличием слабодистрофических изменений в подлежащих тканях глаза наблюдается при лечении гелеобразующим раствором Pluronic F127 и может свидетельствовать о лёгкой степени изменений. В 3-ей группе с применением стандартных капель дистрофические изменения носили выраженный характер, также как некробиотические изменения клеточных и внеклеточных структур, что свидетельствует о выраженной степени патологических изменений. ГЛП на основе ПАК/МЦ, ПВП и ЛМКЛ носили умеренный характер пролиферативных, дистрофических и некробиотических изменений с развитием воспалительной реакции смешанного характера. Из вышеперечисленного следует, что ГЛП и ЛМКЛ с цiproфлоксацином оказывает менее эффективное лечение, чем Pluronic F127, но более эффективнее, чем 0,03% капли Ципролета.

Таким образом, гелеобразующий раствор на основе Pluronic F127 ускоряет процессы купирования отёка, гиперемии, слезотечения и гнойного отделяемого в слизистой глаза и является наиболее эффективной мукоадгезивной глазной лекарственной формой, содержащей антимикробный препарат-ципрофлоксацин при лечении экспериментальной гнойной язвы роговицы.

При использовании ГЛП и ЛМКЛ доказано высокое содержание цiproфлоксацина в 3 раза больше, чем при 0,03% каплях Ципролета. Обнаружено, что гелеобразующий раствор на основе Pluronic F127 создаёт наибольший уровень цiproфлоксацина в 5 раз больше, чем при 0,03% каплях Ципролета.

Резюмируя данную диссертационную работу можно заключить, что автором проведена экспериментальная комплексная оценка эффективности лечения патологии роговицы глаза с целью профилактики гнойно-воспалительных заболеваний, которая напрямую зависит от применяемого вида глазной лекарственной форм и обеспечивающая различный уровень концентрации цiproфлоксацина. Так, разработанные новые мукоадгезивные ГЛП на основе ПАК/МЦ в пропорции 30-70 вес % и гелеобразующие растворы на основе полимера Pluronic F127 могут конкурировать со стандартными 0,03% каплями цiproфлоксацина. Глазные капли требуют частых инстилляций в течение дня, которые не могут обеспечить одинаковую биодоступность, как при использовании новых мукоадгезивных ГЛФ. Офтальмофармакология не располагает полным объемом информации о мукоадгезивных глазных лекарственных пленках на основе полимеров неионной природы, способных

образовывать гель на поверхности роговицы. Поэтому, научный вклад проведенного экспериментального исследования не только расширит имеющиеся представления об использовании мукоадгезивных глазных лекарственных форм в лечении патологии роговицы в экспериментах *in vivo*, но и позволит 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%)

## 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 соответствует 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 ( $p=0,001$ ).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. 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.
2. Разработанная малоинвазивная методика исследования удерживаемости может быть использована для изучения различных глазных лекарственных форм в экспериментах *in vivo*.
3. Результаты комплексного экспериментального исследования диссертационной работы расширят 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.
4. Высокая концентрация ЦФ-на 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 вес %).



## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Статистический сборник «Здоровье населения РК и деятельность организаций здравоохранения в 2013 г» // Астана. – 2014.
- 2 Информационный бюллетень №282 от 14 августа 2014 г.
- 3 Майчук Ю.Ф. Терапевтические алгоритмы при инфекционных заболеваниях роговицы. // Вестн. Офтальм.- 2000. - С. 153-154.
- 4 Статистический сборник «Здоровье населения РК и деятельность организаций здравоохранения в 2017 г». Астана. – 2018.
- 5 Nergei A, Thylefors B. The global impact of eye injuries. *Ophthalmic Epidemiology*. 1998. 5(3): P. 115-116.
- 6 Гундорова Р.А., Степанов А.В., Курбанова Н.Ф. Современная офтальмотравматология. Москва. ОАО Издательство «Медицина» // 2007. - С. 256.
- 7 Сосновский С.В., Бойко Э.В., Харитонов Н.Н. Обоснование и разработка системы количественной оценки тяжести пролиферативной ретинопатии // Офтальмохирургия. – 2009. -№4. – С. 22.
- 8 Bourne RRA, Flaxman SR, Braithwaite T, Cicinelli MV, Das A, Jonas JB, et al.; Vision expert Group. Magnitude, temporal trends and projections of the global prevalence of blindness and distance and near vision empairment: a systemic review and meta-analysis // *Lancet Glob Health*. - 2017. –№ 5(9). P. 888-97.
- 9 Азнабаев М.Т., Азаматова Г.А. Метод профилактики внутриглазных инфекций после факоэмульсификации катаркты с помощью глазной лекарственной пленки с левофлоксацином //Вестник Оренбургского государственного университета. – 2010. - №12. – С. 8-10.
- 10 Вохмяков А.В., Околов И.Н., Гурченков П.А. // Клиническая офтальмология - 2007. -№1. – С. 36-39.
- 11 Майчук Ю.Ф. Состояние перспективы фармакотерапии инфекционных и аллергических заболеваний глаз // Вест. РАМН. – 2003. -№5. - С. 23-28.
- 12 Милованова Л.Н., Тарусова Н.М., Юаюошина Е.В. Технология изготовления лекарственных форм. // Ростов-на-Дону. - 2002.- Т.2. - №2. - С. 448.
- 13 Wispelway B. Clinical implications of pharmacokinetic and pharmacodynamic of fluoroquinolones // *Jour. Infec. Dis*. – 2005. – Vol.2. – №1. – P. 27-35.
- 14 Sieg J.W., Robinson J.R. Corneal absorption of the fluoromethalone in rabbits. // *Arch. Ophthalmol*. – 1974. - №92. P. 240-243.
- 15 РЦРЗ РК Клинический протокол диагностики и лечения кератита // 12 декабря 2014 г.- Протокол № 9.
- 16 ESCRS Guidelines on prevention, investigation and management of postoperative endophthalmithis. Version 2 // Editors: P.Barry, W.Behrens-Baumann, U.Pleyer, D. Seal. ESCRS. - 2007.- P. 37.

- 17 Binder S.P. Pre-soaked IOLs make for efficient drug delivery system // Jour. Eurotimes. – 2008. Vol.13. - №7/8. - P. 19.
- 18 Ong-Tone L. Aqueous humor penetration of gatifloxacin and moxifloxacin eyedrops given different concentrations in a wick before cataract surgery // Jour. Cataract Refract Surg. – 2007. – Vol.33. - №1. – P. 27-35.
- 19 Yu CQ, Ya CN. Prevention of postcataract endophthalmitis: evidencebased medicine // Curr Opin. Ophthalmol. – 2012. – Vol.23. - №1. – P. 19-25.
- 20 Washington N., Washington C., Wilson C.G. Ocular drug delivery. In: Physiological Pharmaceutics: Barriers to Drug Absorption // 2001. 2-nd ed. CRC Press. FL, USA. P. 249–270.
- 21 Wilson C.G., Zhu Y.P., Kumala P., Rao L.S., Dhillon B. Ophthalmic drug delivery. In: Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists. Hillery A.M., Lloyd A.W., Swarbrick J. (Eds). CRS Press, FL, USA. // 2001. - P.329 –353.
- 22 Авксеньева М.В. Воробьев П.А. Комплексная оценка клинической и экономической эффективности медицинских вмешательств как один из подходов к управлению качеством процесса оказания медицинской помощи. // Проблемы управления здравоохранением. 2002.- № 2.
- 23 Стародубов В.И. Ключевые факторы повышения инновационного потенциала медико-биологических исследований // Экономика здравоохранения. - 2004. - № 4. - С. 16-20.
- 24 Morrison P.W.J., Khutoryanskiy V.V. Advances in ophthalmic drug delivery, Therapeutic Delivery. - 2014. -№5 (12). - P.1297–1315.
- 25 Conrad J.M., Reay W.A., Polcyn E. & all. Influens of tonicity and pH on lacrimation and ocular drug bioavailability // J. patenter Drug. Assoc. -1978. – №32. – P.149-161.
- 26 Aulton M.E., Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design, 2nd edition, Churchill Livingstone, Edinburgh. – 2002.
- 27 Florence A.T., Attwood D. Physicochemical Principles of Pharmacy.- 3rd edition, Palgrave, Basingstoke.- 1998.
- 28 Майчук Ю.Ф. Успехи и проблемы эпидемиологии и фармакотерапии воспалительных заболеваний глаз // Тезисы докладов VII съезда офтальмологов России. – Москва. - 2000. – С.153-154.
- 29 Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк В.В. // Вища школа. Голов. изд-во. 3 –ье изд. перераб. и доп. Киев - 1983. – С.5-6.
- 30 Ожмухаметова Э.К., Мухамбетов Д.Д., Хуторянский В.В. Системы доставки глазных лекарств // Медиц. Журнал Астана. – 2018. – №4. – С.48-56.
- 31 Pascolini D., Mariotti S.P. Global estimates of visual impairment // Br. Jour. Ophtal. – 2012. – №5 (96). – P. 614-618.
- 32 Hosoya K., Tomi M., Tachikawa M. Strategies for therapy of retinal diseases using systemic drug delivery: relevance of transporters at the blood-retinal barrier //Expert Opin Drug Deliv. – 2011. –№8 (12). – P. 1571-1587.
- 33 Gaudana R., Jwala J., Boddu SHS. Mitra AK. Recent perspectives in ocular drug delivery // Pharm Res. – 2009. – №26 (5). – P.1197-1216.

- 34 Gaudana R, Ananthula HK, Parenky A, Mitra AK Ocular drug delivery // AAPS J. – 2010. – №12 (3). – P.348-360.
- 35 Macha S, Mitra AK Overview of ocular drug delivery. In: Mitra AK (Ed) Ophthalmic drug delivery systems // 2-nd edn. Marcel Dekker, New York. – 2003. – P.1-12.
- 36 Sieg J.W., Robinson J.R. Vehicle effects on ocular drug bioavailability. Evaluation of pilocarpine. // J. pharm. Sci. – 1977. - №66. - P.1222-1228.
- 37 Jarvinen K., Jarvinen T., Urtti A. Ocular absorption following topical delivery // Adv. Drug Delivery Reviews. - 1995. - №16. - P.3-19.
- 38 Ludwig A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. // Adv. Drug Delivery Reviews. - 2005. - №57. - P.1595-1639.
- 39 Morrison P.W.J., Khutoryanskiy V.V. Advances in Ophthalmic Drug Delivery, Therapeutic Delivery. // – 2014. - №5 (12). - P.1307-1325.
- 40 Shell JW. Ophthalmic drug delivery systems // Drug Dev Res. - 1985. - №6 (3). - P. 245–261.
- 41 Lee VH, Robinson JR. Topical ocular drug delivery: recent developments and future challenges // J Ocul Pharmacol. - 1986. - №2(1). - P. 67–108.
- 42 Hughes PM, Olejnik O, Chang-Lin JE, Wilson CG. Topical and systemic drug delivery to the posterior segments. // Adv Drug Deliv Rev. – 2005. - №57 (14). - P. 2010–2032.
- 43 Furrer E, Berdugo M, Stella C, Behar-Cohen F, Gurny R, Feige U et al. Pharmacokinetics and posterior segment biodistribution of ESBA105, an anti-TNF- $\alpha$  single-chain antibody, upon topical administration to the rabbit eye // Invest Ophthalmol Vis Sci. - 2009. - №50 (2). - P.771–778.
- 44 Duvvuri S, Majumdar S, Mitra AK. Drug delivery to the retina: challenges and opportunities // Expert Opin Biol Ther. – 2003. - №3 (1). - P.45–56.
- 45 Barar J, Javadzadeh AR, Omid Y. Ocular novel drug delivery: impacts of membranes and barriers // Expert Opin Drug Deliv. - 2008. - №5 (5). - P.567-581.
- 46 Olsen TW, Aaberg SY, Geroski DH, Edelhauser HF. Human sclera: thickness and surface area // Am J Ophthalmol. - 1998. - №125 (2).-P.237-241.
- 47 Ranta VP, Mannermaa E, Lummeppuro K, Subrizi A, Laukkanen A, Antopolsky M et al. Barrier analysis of periocular drug delivery to the posterior segment // J. Control Release. – 2010. - №148 (1). - P.42–48.
- 48 Mac Gabhann F, Demetriades AM, Deering T, Packer JD, Shah SM, Duh E et al. Protein transport to choroid and retina following periocular injection: theoretical and experimental study // Ann Biomed Eng. – 2007. - №35 (4). - P.615–630.
- 49 Macha S, Mitra AK. Overview of ocular drug delivery. In: Mitra AK (Ed) Ophthalmic drug delivery systems // 2003. – 2-nd edn. Marcel Dekker, New York. - P. 1–12.
- 50 Schoenwald RD. Ocular drug delivery. Pharmacokinetic considerations // Clin Pharmacokinet. – 1990. - №18 (4). - P.255–269.
- 51 Mishima S. Clinical pharmacokinetics of the eye. Proctor lecture // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 1981. - №21 (4). - P.504–541.

- 52 Davies NM. Biopharmaceutical considerations in topical ocular drug delivery // Clin Exp Pharmacol Physiol. - 2000. - №27 (7). - P.558–562.
- 53 Durairaj C, Shah JC, Senapati S, Kompella UB. Prediction of vitreal half-life based on drug physicochemical properties: quantitative structure-pharmacokinetic relationships (QSPKR) // Pharm Res.-2009 (a).-№26 (5). - P.1236–1260.
- 54 Gaudana R, Jwala J, Boddu SHS, Mitra AK Recent perspectives in ocular drug delivery // Pharm Res.-2009. - №26 (5).-P. 1197–1216.
- 55 Macha S, Mitra AK. Overview of ocular drug delivery. In: Mitra AK (Ed) // Ophthalmic drug delivery systems, 2-nd edn. Marcel Dekker, New York. - 2003. - P. 1–12.
- 56 Eytan GD, Kuchel PW. Mechanism of action of P-glycoprotein in relation to passive membrane permeation // Int Rev Cytol. - 1999. - №190. - P.175–250.
- 57 Dey S, Pal D, Mitra AK. Identification and functional characterization of a Na<sup>+</sup>-independent large neutral amino acid transporter, LAT1, in human and rabbit cornea // Invest Ophthalmol Vis Sci. - 2003. - №44 (7). - P. 2919–2927.
- 58 Mannermaa E, Vellonen KS, Urtti A. Drug transport in corneal epithelium and blood-retina barrier: emerging role of transporters in ocular pharmacokinetics // Adv Drug Deliv Rev. -2006.- №58 (11). - P. 1136–1163.
- 59 Saha P, Yang JJ, Lee VH. Existence of a p-glycoprotein drug efflux pump in cultured rabbit conjunctival epithelial cells // Invest Ophthalmol Vis Sci.-1998. - №39 (7). - P.1221–1226.
- 60 Wu J, Zhang JJ, Koppel H, Jacob TJ. P-glycoprotein regulates a volume-activated chloride current in bovine non-pigmented ciliary epithelial cells // J. Physiol. - 1996. -№491 (Pt 3). - P.743–755.
- 61 Aukunuru JV, Sunkara G, Bandi N, Thoreson WB, Kompella UB. Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in human retinal pigment epithelial cells and its interaction with BAPSG, a novel aldose reductase inhibitor // Pharm Res. - 2001. - №18 (5). - P.565–572.
- 62 Steuer H, Jaworski A, Elger B, Kaussmann M, Keldenich J, Schneider H et al. Functional characterization and comparison of the outer blood-retina barrier and the blood-brain barrier // Invest Ophthalmol Vis Sci. - 2005.- №46 (3). - P.1047–1053.
- 63 Hosoya K, Lee VH, Kim KJ. Roles of the conjunctiva in ocular drug delivery: a review of conjunctival transport mechanisms and their regulation // Eur J Pharm Biopharm.-2005. - №60 (2). - P. 227–240.
- 64 Hosoya K, Tachikawa M. The inner blood-retinal barrier: molecular structure and transport biology // Adv Exp Med Biol. - 2012. - №763. - P.85–104.
- 65 Hosoya K, Lee VH, Kim KJ. Roles of the conjunctiva in ocular drug delivery: a review of conjunctival transport mechanisms and their regulation // Eur. J. Pharm. Biopharm. - 2005. - №60 (2). - P.227–240.
- 66 Hosoya K, Horibe Y, Kim KJ, Lee VH. Na (+)-dependent L-arginine transport in the pigmented rabbit conjunctiva // Exp Eye Res. - 1997. - №65 (4). -P. 547–553.

- 67 Hosoya K, Tachikawa M. The inner blood-retinal barrier: molecular structure and transport biology // *Adv Exp Med Biol.* - 2012. - №763. - P.85–104.
- 68 Hosoya K, Lee VH. Cidofovir transport in the pigmented rabbit conjunctiva // *Curr Eye Res.* - 1997. - №16 (7). - P.693–697.
- 69 Jain-Vakkalagadda B, Pal D, Gunda S, Nashed Y, Ganapathy V, Mitra AK. Identification of a Na<sup>+</sup>-dependent cationic and neutral amino acid transporter, B (0, +), in human and rabbit cornea // *Mol Pharm.* - 2004. - №1 (5). - P.338–346.
- 70 Zhang T, Xiang CD, Gale D, Carreiro S, Wu EY, Zhang EY. Drug transporter and cytochrome P450 mRNA expression in human ocular barriers: implications for ocular drug disposition // *Drug Metab Dispos.* - 2008. - №36 (7). - P. 1300–1307.
- 71 Xiang CD, Batugo M, Gale DC, Zhang T, Ye J, Li C et al. Characterization of human corneal epithelial cell model as a surrogate for corneal permeability assessment: metabolism and transport // *Drug Metab Dispos.* - 2009. - №37 (5). - P.992–998.
- 72 Talluri RS, Katragadda S, Pal D, Mitra AK. Mechanism of L-ascorbic acid uptake by rabbit corneal epithelial cells: evidence for the involvement of sodium-dependent vitamin C transporter // *2Curr Eye Res.* - 2006. - №31 (6). - P.481–489.
- 73 Janoria KG, Hariharan S, Paturi D, Pal D, Mitra AK. Biotin uptake by rabbit corneal epithelial cells: role of sodium-dependent multivitamin transporter (SMVT) // *Curr Eye Res.* - 2006. - №31 (10). - P.797–809.
- 74 Sigurdsson HH, Kirch J, Lehr CM. Mucus as a barrier to lipophilic drugs // *Int. J. Pharm.* - 2013. - №453 (1). - P.56–64.
- 75 Gu JM, Robinson JR, Leung SH. Binding of acrylic polymers to mucin/epithelial surfaces: structure-property relationships // *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* - 1988. - №5 (1). - P.21–67.
- 76 Ruponen M, Urtti A. Undefined role of mucus as a barrier in ocular drug delivery // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* - 2015. - №96. - P.442–446.
- 77 Kaur IP, Smitha R. Penetration enhancers and ocular bioadhesives: two new avenues for ophthalmic drug delivery // *Drug Dev Ind Pharm.* - 2002. - №28 (4). - P.353–369.
- 78 Horvat G, Budai-Szucs M, Berko S, Szabo-Revesz P, Soos J, Facsko A et al. Comparative study of nanosized cross-linked sodium-, linear sodium- and zinc-hyaluronate as potential ocular mucoadhesive drug delivery systems // *Int. J. Pharm.* - 2015. - №494 (1). - P. 321–328.
- 79 Thrimawithana T.R., Rupenthal I.D., Young S.A., Alany R.G. Environment-sensitive polymers for ophthalmic drug delivery // *Journ. Drug Delivery Science and Technology.* - 2012. - №22. - P. 61-70.
- 80 Kosai Al Khateb, Elvira K. Ozhmukhametova, Marat N. Mussin et al. In situ gelling systems based on Pluronic F127/Pluronic F68 formulations for ocular drug delivery // *Internat. Journ. Of Pharmaceut.* - 2016. - №502 (1-2). - P. 70-79.
- 81 Nurkeeva Z.S., Mun G.A. Khutoryanskiy V.V., Bitekenova A.B., Dzhusupbekova A.B. Polymeric complexes of poly (acrylic acid) and poly (2-



hydroxyethyl vinyl ether) with lidocaine hydrochloride // Journ. Biomat. Sci. Polym. Edn. - 2002. - №13. - P. 759-768.

82 Nurkeeva Z.S., Khutoryanskiy V.V., Mun G.A., Sherbakova M.V. Ivaschenko A.T., Aitkhozhina N.A. Polycomplexes of poly(acrylic acid) with streptomycin sulfate and their antibacterial activity // Europ. Journ. Pharm. and Biopharm. - 2004. - №57 (2). - P. 245-249.

83 Chaيسان W, Srinivas SP, Tiya boonchai W // Mucoadhesive chitosan-dextran sulfate nanoparticles for sustained drug delivery to the ocular surface // J. Ocul Pharmacol Ther. - 2013. - №29 (2). - P.200–207.

84 Ticho U, Blumenthal M, Zonis S, Gal A, Blank I, Mazor ZW. A clinical trial with Piloplex-- a new long-acting pilocarpine compound: preliminary report // Ann Ophthalmol. - 1979. - №11 (4). - P.555–561.

85 Longwell A., Birss S., Keller N. 7 all. Effect of topically applied pilocarpine on tear film pH. // J. Pharm. Assoc. - 1976. - №65. -P. 1654-1657.

86 Sachinkumar P, Atul K, Sandip B, Shitalkumar P. Formuation and evaluation of an in situ gel for ocular drug delivery of anticonjunctival drug // Cellul Chem Technol. - 2015. - №49 (1). - P.35–40.

87 Batrakova E.V., Kabanov A.V. Pluronic Block Copolymers: Evolution of Drug Delivery Concept from Inert Nanocarriers to Biological Response Modifiers // Journ. Control Release. - 2008. - №130 (2). - P.98-106.

88 Ожмухаметова Э.К., Мусин М.Н., Рахыпбеков Т.К., Исаханов Д.Р., Аукенов Н.Е., Хуторянский В.В. Разработка методов in vivo оценки удерживаемости рибофлавина и флюоресцеина при доставке в глаза // Доклады НАН РК. - 2016. - №1. - С. 108-114.

89 Oh K.T., Bronich T.K., Kabanov A.V. Micellar formulations for drug delivery based on mixtures of hydrophobic and hydrophilic Pluronic block copolymers // Journ. Control Release. -2004. -№94 (1).- P.411-422.

90 Sek L., Boyd B.J., Charman W.N. Porter C.J. Examination of the impact of a range of Pluronic surfactants on the in-vitro solubilisation behavior and oral bioavailability of lipidic formulations of atovaquone // Journ. Pharm. Pharmacol. - 2006.- №58 (6).- P.809-820.

91 Kadam Y., Yerramilli U., Bahadur A. Solubilisation of poorly water-soluble drug carbamazepine in Pluronic micelles: Effect of molecular characteristics, temperature and adde salt on the solubilizing capacity // Colloids & Surfaces B: Biointerfaces.- 2009.- №72.- P.141-147.

92 Pandit N.K., McGowan R. Gelation of Pluronic F12-Polyethylene Glycol Mixtures: Relationship to PEG Molecular Weight // Drug Develop. Ind. Pharm. - 1998.- № 24.- P.183-186.

93 Ibrachim el-S.A., Ismail S., Fetih G., Shaaban O., Hassanein K., Abdellah N.H. Development and characterization of thermosensitive pluronic-based metronidazole in situ gelling formulations for vaginal application // Acta Pharm.- 2012.- №62.- P.59-70.

94 Akash M.S., Das M., Jain S. In situ gel systems as 'smart' carriers for sustained ocular drug delivery // Expert Opin Drug Deliv.- 2012.- №9.- P.383-402

- 95 Lin H.R., Sung K.C., Vong W.J. In situ gelling of alginate/pluronic solutions for ophthalmic delivery of pilocarpine // *Biomacromolecules*.- 2004.- №5.- P.2358-2365.
- 96 Varshosaz J., Tabbacian M., Salmani Z. Designing of a thermosensitive Chitosan/Ploxamer in situ gel for ocular drug delivery of ciprofloxacin // *The Open Drug Delivery Journal*.- 2008.- №2.- P.61-70.
- 97 El-Kamel A.H. In vitro and in vivo evaluation of Pluronic F127-based ocular drug delivery system for timolol maleate // *Inter. Journ.Pharm.*- 2002.- №241.- P.47-55.
- 98 Kirchhof S, Goepferich AM, Brandl FP. Hydrogels in ophthalmic applications // *Eur. J. Pharm. Biopharm.*- 2015.- №95(Pt B).- P.227–238.
- 99 Holden CA, Tyagi P, Thakur A, Kadam R, Jadhav G, Kompella UB et al. Polyamidoamine dendrimer hydrogel for enhanced delivery of antiglaucoma drugs // *Nanomed Nanotechnol BiolMed.*- 2012.- №8 (5).- P.776–783.
- 100 Yu J, Xu X, Yao FL, Luo ZC, Jin L, Xie BB et al. In situ covalently cross-linked PEG hydrogel for ocular drug delivery applications // *Int. J. Pharm.* -2014.- №470 (1–2). -P.151–157.
- 101 Xu X, Weng YH, Xu L, Chen H. Sustained release of avastin (R) from polysaccharides cross-linked hydrogels for ocular drug delivery // *Int J Biol Macromol.*- 2013.- № 60.- P.272–276.
- 102 Agrawal AK, Das M, Jain S. In situ gel systems as ‘smart’ carriers for sustained ocular drug delivery // *Expert Opin Drug Deliv.*- 2012.- №9(4).- P.383–402
- 103 Lee VH. Esterase activities in adult rabbit eyes // *J Pharm Sci.* - 1983. - №72 (3). - P.239–244.
- 104 Stratford RE Jr, Lee VH. Ocular aminopeptidase activity and distribution in the albino rabbit // *Curr Eye Res.* - 1985. - № 4(9). - P.995–999.
- 105 Sjoquist B, Stjernschantz J. Ocular and systemic pharmacokinetics of latanoprost in humans // *Surv Ophthalmol.* -2002.- №47(Suppl. 1).- P.S6–S12.
- 106 Chang SC, Bundgaard H., Buur A., Lee VH. Improved corneal penetration of timolol by prodrugs as a means to reduce systemic drug load // *Invest ophtalmol vis science.*- 1987.- №28(3).- P.487-491.
- 107 Hughes PM, Mitra AK (1993) Effect of acylation on the ocular disposition of acyclovir. II: corneal permeability and anti-HSV 1 activity of 2-esters in rabbit epithelial keratitis // *Jour Ocular Pharmacol* 9(4). P. – 299-309.
- 108 Katragadda S, Talluri RS, Mitra AK. Modulation of P-glycoprotein-mediated efflux by prodrug derivatization: an approach involving peptide transporter-mediated influx across rabbit cornea // *J Ocul Pharmacol Ther.* -2006. -№22(2).- P.110–120.
- 109 Vadlapudi AD, Vadlapatla RK, Kwatra D, Earla R, Samanta SK, Pal D et al. Targeted lipid based drug conjugates: a novel strategy for drug delivery // *Int J Pharm.*- 2012a.- №434(1-2).- P.315–324.
- 110 Vadlapudi AD, Vadlapatla RK, Mitra AK. Current and emerging antivirals for the treatment of cytomegalovirus (CMV) retinitis: an update on recent patent // *Recent Pat Antiinfect Drug Discover.* - 2012 (b). -№7 (1). -P.8-18.

- 111 Tirucheraï GS, Dias C, Mitra AK. Corneal permeation of ganciclovir: mechanism of ganciclovir permeation enhancement by acyl ester prodrug design // *J Ocul Pharmacol Ther.* - 2002. - №18(6).- P.535–548.
- 112 Majumdar S, Nashed YE, Patel K, Jain R, Itahashi M, Neumann DM et al. Dipeptide monoester ganciclovir prodrugs for treating HSV-1-induced corneal epithelial and stromal keratitis: in vitro and in vivo evaluations // *J Ocul Pharmacol Ther.*- 2005.- №21(6).- P.463–474.
- 113 Civiale C, Bucaria F, Piazza S, Peri O, Miano F, Enea V. Ocular permeability screening of dexamethasone esters through combined cellular and tissue systems // *Jour Ocul Pharmacol Ther.*- 2004.- №20(1).- P.75–84.
- 114 Lallemand F, Furrer P, Felt-Baeyens O, Gex-Fabry M, Dumont JM, Besseghir K et al. A novel water-soluble cyclosporine A prodrug: ocular tolerance and in vivo kinetics // *Int Jour Pharm.* -2005.- №295(1–2).- P.7–14.
- 115 Lallemand F, Varesio E, Felt-Baeyens O, Bossy L, Hopfgartner G, Gurny R. Biological conversion of a water-soluble prodrug of cyclosporine A // *Eur J Pharm Biopharm.*- 2007.- №67(2).- P.555–561.
- 116 Rodriguez-Aller M, Kaufmann B, Guïllarme D, Stella C, Furrer P, Rudaz S et al. In vivo characterisation of a novel water-soluble cyclosporine A prodrug for the treatment of dry eye disease // *Eur J Pharm Biopharm.* - 2012. - №80 (3).- P.544–552.
- 117 Shen J, Gan L, Zhu C, Zhang X, Dong Y, Jiang M et al. Novel NSAIDs ophthalmic formulation: flurbiprofen axetil emulsion with low irritancy and improved anti-inflammation effect // *Int J Pharm.*- 2011.- №412(1-2).- P.115–122.
- 118 Mainolfi N, Powers J, Amin J, Long D, Lee W, McLaughlin ME et al. An effective prodrug strategy to selectively enhance ocular exposure of a cannabinoid receptor (CB1/2) agonist // *J Med Chem.* - 2013. -№56(13).- P.5464–5472.
- 119 de Paiva CS, Schwartz CE, Gjørstrup P, Pflugfelder SC. Resolvin E1 (RX-10001) reduces corneal epithelial barrier disruption and protects against goblet cell loss in a murine model of dry eye // *Cornea.*- 2012.- №31(11).- P.1299–1303.
- 120 Reimondez-Troitino S, Csaba N, Alonso MJ, de la Fuente M. Nanotherapies for the treatment of ocular diseases // *Eur J Pharm Biopharm.*- 2015.- №95(Pt B).- P.279–293.
- 121 Pignatello R, Bucolo C, Ferrara P, Maltese A, Puleo A, Puglisi G. Eudragit RS100 nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen // *Eur J Pharm Sci.*- 2002.- №16(1–2).- P.53–61.
- 122 Badawi AA, El-Laithy HM, El Qidra RK, El Mofty H, El dally M. Chitosan based nanocarriers for indomethacin ocular delivery // *Arch Pharm Res.*- 2008.- №31(8).- P.1040–1049.
- 123 Khan W, Aldouby YH, Avramoff A, Domb AJ. Cyclosporin nanosphere formulation for ophthalmic administration // *Int J Pharm.*- 2012.- №437(1–2).- P.275–276.
- 124 Ibrahim HK, El-Leithy IS, Makky AA. Mucoadhesive nanoparticles as carrier systems for prolonged ocular delivery of gatifloxacin/prednisolone biotherapy // *Mol Pharm.* -2010. - №7(2).- P.576–585.



- 125 Gupta C, Chauhan A. Ophthalmic delivery of cyclosporine A by punctal plugs // *Journ Control Release*. - 2011. - №150 (1). - P.70–76.
- 126 Nair KL, Vidyanand S, James J, Kumar GSV. Pilocarpine-loaded poly (DLlactic-co-glycolic acid) nanoparticles as potential candidates for controlled drug delivery with enhanced ocular pharmacological response // *Journ Appl Polym Sci*. - 2012.-№124. - P.2030–2036.
- 127 Wadhwa S, Paliwal R, Paliwal SR, Vyas SP. Hyaluronic acid modified chitosan nanoparticles for effective management of glaucoma: development, characterization, and evaluation // *Journ Drug Target*.- 2010.- №18(4).- P.292–302.
- 128 Mehanna MM, Elmaradny HA, Samaha MW. Mucoadhesive liposomes as ocular delivery system: physical, microbiological, and in vivo assessment // *Drug Dev Ind Pharm*. - 2010. - №36 (1). - P.108-118.
- 129 Ghate D, Edelhauser HF. Ocular drug delivery // *Expert Opin Drug Deliv*. - 2006. - №3 (2). -P.275–287.
- 130 Kuno N, Fujii S. Recent advances in ocular drug delivery systems // *Polymers (Basel)*. - 2011. - № 3(1). - P.193–221.
- 131 Bock F, Matthaei M, Reinhard T, Bohringer D, Christoph J, Ganslandt T et al. High-dose subconjunctival cyclosporine A implants do not affect corneal neovascularization after high-risk keratoplasty // *Ophthalmology*.- 2014.- №121(9).- P.1677–1682.
- 132 Pehlivan SB, Yavuz B, Calamak S, Ulubayram K, Kaffashi A, Vural I et al. Preparation and in vitro/in vivo evaluation of cyclosporin A-loaded nanodecorated ocular implants for subconjunctival application // *J Pharm Sci*.- 2015.- №104(5).- P.1709–1720.
- 133 Ang M. Evaluation of a prednisolone acetate-loaded subconjunctival implant for the treatment of recurrent uveitis in a rabbit model // *PLoS One*. - 2014. - №9 (8).- P.e97555.
- 134 Wong VG. Biodegradable ocular implants // *Google Patents*. - 1989.
- 135 Moosa RM, Choonara YE, du Toit LC, Kumar P, Carmichael T, Tomar LK et al. A review of topically administered mini-tablets for drug delivery to the anterior segment of the eye // *J Pharm Pharmacol*. - 2014. - №66 (4). - P.490–506.
- 136 Kompella UB, Kadam RS, Lee VH. Recent advances in ophthalmic drug delivery // *Ther Deliv*. - 2010. - №1 (3). - P.435–456.
- 137 Yellepeddi VK, Sheshala R, McMillan H, Gujral C, Jones D, Raghu Raj Singh T. Punctal plug: a medical device to treat dry eye syndrome and for sustained drug delivery to the eye // *Drug Discov Today*.- 2015.- №20(7).- P.884–889.
- 138 Chee SP. Moxifloxacin punctum plug for sustained drug delivery // *Ocul Pharmacol Ther*. - 2012. - №28 (4). - P.340–349.
- 139 Gupta C, Chauhan A. Ophthalmic delivery of cyclosporine A by punctal plugs // *J. Control Release*. - 2011. - №150 (1). - P.70–76.
- 140 Taban M, Chen B, Perry JD. Update on punctal plugs // *Compr Ophthalmol Updat*.- 2006.- №7(5).- P.205–212, discussion 213–214.
- 141 Bourkiza R, Lee V. A review of the complications of lacrimal occlusion with punctal and canalicular plugs // *Orbit*. - 2012. -№31(2).- P.86–93.

- 142 Sedlacek J. Possibility of the application of ophthalmic drugs with the use of gel contact lenses // *Cesk Oftalmol.* - 1965. - №21 (6). - P.509–512.
- 143 Chauhan A. Ocular drug delivery role of contact lenses // *Allied Ophthal Sci.* - 2015. - №26 (2). - P.131–135.
- 144 Lu C, Yoganathan RB, Kociolek M, Allen C. Hydrogel containing silica shell cross-linked micelles for ocular drug delivery // *J. Pharm. Sci.*- 2013.- №102(2).- P.627–637.
- 145 Hillman JS. Management of acute glaucoma with pilocarpine-soaked hydrophilic lens // *Br J Ophthalmol.* -1974. - №58 (7). P.674–679.
- 146 Hirattani H., Alvarez-Lorenzo C. Timolol uptake and release by imprinted soft contact lenses made of N,N-diethylacrilamide and methacrylic acid // *J. Contr. Release.*- 2002.- №83.- P.223-230.
- 147 Schultz C.L., Poling T.R., Mint J.O. A medical device/drug delivery system for treatment of glaucoma // *Clin. Exp. Optom.* - 2009. - №92. - P.343-348.
- 148 Karlgard CC, Wong NS, Jones LW, Moresoli C (2003) In vitro uptake and release studies of ocular pharmaceutical agents by silicon-containing and p-HEMA hydrogel contact lens materials. *Int J Pharm* 257(1–2):141–151.
- 149 Phan CM, Subbaraman L, Jones L (2014) Contact lenses for antifungal ocular drug delivery: a review. *Expert Opin Drug Deliv* 11(4):537–546.
- 150 Jung HJ, Chauhan A (2012) Temperature sensitive contact lenses for triggered ophthalmic drug delivery. *Biomaterials* 33(7):2289–2300.
- 151 Mohammadi S, Jones L, Gorbett M (2014) Extended latanoprost release from commercial contact lenses: in vitro studies using corneal models. *PLoS One* 9(9), e106653.
- 152 Carmen AL, Fernando Y, Rafael BI, Angel C (2006) Imprinted soft contact lenses as norfloxacin delivery systems. *J Control Release* 113:236–424.
- 153 Hui A, Sheardown H, Jones L (2012) Acetic and acrylic acid molecular imprinted model silicone hydrogel materials for ciprofloxacin-hcl delivery. *Materials* 5(1):81–107.
- 154 Peng CC, Burke MT, Carbia BE, Plummer C, Chauhan A (2012) Extended drug delivery by contact lenses for glaucoma therapy. *J Control Release* 162(1):152–158.
- 155 Hsu KH, Carbia BE, Plummer C, Chauhan A (2015) Dual drug delivery from vitamin E loaded contact lenses for glaucoma therapy. *Eur J Pharm Biopharm* 94:312–321.
- 156 Eperon S, Bossy-Nobs L, Petropoulos IK, Gurny R, Guex-Crosier Y (2008) A biodegradable drug delivery system for the treatment of postoperative inflammation. *Int J Pharm* 352 (1–2):240–247.
- 157 Shukla A, Fuller RC, Hammond PT (2011) Design of multi-drug release coatings targeting infection and inflammation. *J Control Release* 155(2):159–166.
- 158 Molokhia SA, Sant H, Simonis J, Bishop CJ, Burr RM, Gale BK et al (2010) The capsule drug device: novel approach for drug delivery to the eye. *Vision Res* 50(7):680–685.

- 159 Molokhia SA, Jeong EK, Higuchi WI, Li SK (2008) Examination of barriers and barrier alteration in transscleral iontophoresis. *J Pharm Sci* 97(2):831–844.
- 160 Molokhia SA, Thomas SC, Garff KJ, Mandell KJ, Wirostko BM (2013) Anterior eye segment drug delivery systems: current treatments and future challenges. *J Ocul Pharmacol Ther* 29(2):92–105.
- 161 Halhal M, Renard G, Courtois Y, BenEzra D, Behar-Cohen F (2004) Iontophoresis: from the lab to the bed side. *Exp Eye Res* 78:751–757.
- 162 Cohen AE, Assang C, Patane MA, From S, Korenfeld M (2012) Avion study investigators. Evaluation of dexamethasone phosphate delivered by ocular iontophoresis for treating noninfectious anterior uveitis. *Ophthalmology* 119(1):66–73.
- 163 Hobden JA, Reidy JJ, O’Callaghan RJ, Insler MS, Hill JM (1990) Ciprofloxacin iontophoresis for aminoglycoside-resistant pseudomonal keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31(10):1940–1944.
- 164 Bikbova G, Bikbov M (2014) Transepithelial corneal collagen cross-linking by iontophoresis of riboflavin. *Acta Ophthalmol* 92(1):e30–e34.
- 165 Западнюк И.П., Западнюк и др. Разведение, содержание, использование в эксперименте// Лабораторные животные. Голов. Изд-во 1983. – С. 207.
- 166 Revolution for drug industry // *Biotechnol. Newswatch*. 1999. - 11 March. 1. ТЧ r n1. Г., 6.
- 167 Колесников А.В., Щулькин А.В. и другие. Локальный и системный антиоксидантный статус при экспериментальной гнойной язве роговицы // *Казанский медицинский журнал*. 2013- №4.- С.571-575.
- 168 Patton T.F., Robinson J.R. (1975) Influence of the topical anesthesia on tear dynamics and ocular drug bioavailability in albino rabbits. // *J. Pharm. Sci.* 64. P.-267-271.
- 169 Э.К. Ожмухаметова, М.Н. Мусин, А. Баяхметов, Б. Адамбосынов, В.В. Хуторянский (2018) // Экспериментальная гнойная язва роговицы у кроликов для исследования глазных лекарственных форм // *Казанский Медич. Журнал*. 2. С.-248-254.
- 170 Европейская конвенция о защите позвоночных, используемых для экспериментов или в иных научных целях // Страсбург. - 18 марта 1986 года.
- 171 Правила проведения доклинических исследований, медико-биологических экспериментов и клинических испытаний в Республике Казахстан // Приказ № 442. - 25 июля 2007 года.
- 172 Иванова Р.Л. Рекомендации этического комитета Государственного Медицинского университета г. Семей // 2008.
- 173 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: методические указания. МУК 4.2. 1890-04 // *Клиническая микробиологическая антимикробная химиотерапия*. – Т. 6, № 4. – С. 306-359.

174 Ramos M., Aranda A., Garcia E., Reuvers T., Hooghuis H. Simple and sensitive determination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection // J. Chromatogr. B. 2003. Vol. 789, №2. P.373-381.

175 Imre S., Dogaru M.T., Vari C.E., Muntean T., Kelemen L. Validation of an HPLC method for the determination of ciprofloxacin in human plasma // J. Pharm. Biomed. Anal. 2003. Vol. 33, №1. P.125-130.

176 Штыков С.Н. Химический анализ в нанореакторах: основные понятия и применение // Журн. аналит. Химии. 2002. Т.57, №10. С.1018-1028.

177 В.Л. Дорофеев, С.Е. Сюбаева, А.П. Арзамасцев Использование метода ВЭЖХ для анализа частоты лекарственных средств группы фторхинолонов // Вестник ВГУ. 2004. -№2. –С.199-204.

178 В.А. Герасевич, А.Р. Аветисов Современное программное обеспечение для статистической обработки биомедицинских исследований // Белорусский медицинский журнал. 2005 г. - №1.

179 Бахрушина Е.О., Никифорова Д.А., Демина Н.Б. Основные аспекты разработки термореверсивных поликомплексов полоксамеров // J. Health and millennium education. – 2018y. - №2. – С.103-106.

180 Андрей М. Гржибовский, Сергей В. Иванов, Мария А. Горбатова Описательная статистика с использованием пакетов статистических программ Statistica и SPSS // Журн. Наука и здравоохранение. -№2. – 2016 . С.- 10-17.

181 Гржибовский А.М. Типы данных, проверка распределения и описательная статистика // Экология человека. -2008. -№3.- С.52-58.

182 Гржибовский А.М. Анализ номинальных данных (независимые наблюдения) // Экология человека. – 2008. -№6. – С.58-68.

183 Ушаков Н.А., Муравьева Э.В., Фокина Д.В. Консервативное лечение эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы с использованием лечебных мягких контактных линз // Тезис докл. IX съезда офтальмологов России. – М. - 2010. – С.319.

184 Нероев В.В., Гундорова Р.А., Оганесян О.Г. Неавтоматизированная эндокератопластика при посттравматических дистрофиях роговицы // I-ый Российский общенациональный офтальмохирургический форум. Сб. науч. Труд. – М. 2008. – С.218-220.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

### Удостоверение на рационализаторское предложение



#### УДОСТОВЕРЕНИЕ

на рационализаторское предложение  
№ 2439

Настоящее удостоверение выдано  
**Ожмухаметовой Э.К. и др.**  
(фамилия, имя, отчество)

на принятое БРИЗом Государственного  
медицинского университета города Семей к  
внедрению рационализаторское предложение

**СПОСОБ ФОРМИРОВАНИЯ**  
**ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА НА**  
**ПОВЕРХНОСТИ РОГОВИЦЫ.**



М.П.

Ректор

Е.Жунусов

«18» октября 2017 г.



# ПРИЛОЖЕНИЕ Б

## Акт внедрения

G-041.07.01.51-2015

АКТ внедрения результатов  
научно-исследовательской работы

Ред. 1. Страница 1 из 1

### А К Т

внедрения результатов научно-исследовательской работы

Государственный медицинский университет г. Семей

наименование учреждения, где внедряется работа

Наименование предложения Способ формирования патологического процесса на поверхности роговицы.

Работа собственная с PhD- диссертации «Разработка новых мукоадгезивных лекарственных форм для лечения патологий глаза»  
республиканского, областного планов внедрения;

внедрена в инициативном порядке; заимствована из методических рекомендаций;

журнальных статей, диссертаций, монографий - указать

Форма внедрения внедрение способа в эксперименте в условиях ОУНЛ

внедрение метода, способа, аппарата в лечебно-профилактическом учреждении

лекции, семинары, подготовка на рабочем месте и прочее указать

Ответственный за внедрение и исполнитель PhD-doctorant Ожмухаметова Э.К

Эффективность внедрения лечебно-диагностическая

лечебно-диагностическая, экономическая,

социальная - указать конкретно

Предложения, замечания, учреждения, осуществляющего внедрение: внедрение в учебный-методический кафедры фармакологии для студентов 3 курса ОМФ, магистрантов, докторантов.  
процесс внедрения 2017 г.

Ректор, д.м.н.

Зав. лабораторией, к.м.н.

Исполнитель,  
PhD-докторант  
по специальности «Медицина»



Е.Т. Жунусов

Н.Е. Аукунов

Э.К. Ожмухаметова