

ПОНОМАРЕВ ВЯЧЕСЛАВ ОЛЕГОВИЧ

**ЛЕЧЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ ГЛАЗА
С ПОМОЩЬЮ КОНЬЮГАТОВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ
(КВАНТОВЫХ ТОЧЕК)**

3.1.5 – Офтальмология (медицинские науки)

3.3.6 – Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки)

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
доктора медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научные консультанты: Казайкин Виктор Николаевич –

доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник АО Екатеринбургский центр МНТК «Микрохирургия глаза».

Омельяновский Виталий Владимирович –

доктор медицинских наук, профессор, генеральный директор ФГБУ «Центр экспертизы и контроля качества медицинской помощи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Официальные оппоненты: Слонимский Алексей Юрьевич,

доктор медицинских наук, профессор, врач-офтальмолог ООО «Московская глазная клиника»

Дроздова Елена Александровна,

доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой офтальмологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России

Зырянов Сергей Кенсаринович,

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей и клинической фармакологии ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы

Ведущая организация: ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова МО РФ

Защита диссертации состоится «___» _____ 202__ г. в __ часов на заседании Диссертационного совета 21.2.058.10 при ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России (Пироговский Университет) по адресу: 117513, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1, строение 6

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России (Пироговский Университет) по адресу: 117513, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1, строение 6 и на сайте www.rsmu.ru

Автореферат разослан «___» _____ 202__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук



М.В. Ануров

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

На сегодняшний день инфекционные заболевания глаза и его придаточного аппарата продолжают занимать лидирующие позиции в структуре глазной заболеваемости и зачастую лежат в основе функциональной и анатомической потери глаза как органа, обусловленной нарушениями клинико-диагностических и лечебных мероприятий, маршрутизации пациентов, а также в случаях инфекции, вызванной микроорганизмами с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). При этом ведущая роль среди возбудителей инфекционных заболеваний, вызывающих наибольшее число осложнений, принадлежит именно бактериальной микрофлоре (Майчук Д.Ю., 2016; Demarco B. et al., 2022; Singh R.B. et al., 2022).

Бактериальные инфекции переднего и заднего отрезков глаза являются одной из основных причин инвалидизации лиц трудоспособного возраста и провоцируют тенденцию к росту государственной финансовой обремененности в сфере здравоохранения (Слонимский С.Ю. и др., 2022). Например, инфекционные кератиты продолжают занимать от 3-го до 4-го места в структуре глазной заболеваемости, и на их долю приходится до 15% случаев обращений граждан с офтальмопатологией в структуры амбулаторного и стационарного звена. При этом отсутствие этиопатогенетического лечения в 25% случаев характеризуется значительным снижением зрительных функций, вплоть до полной слепоты, или анатомической потерей глазного яблока, частота энуклеации при этом может составлять до 23,7% (Старков Г.Л. и др., 1988; Майчук Ю.Ф. и др., 1990; Ситник Г.В. и др., 2007; Шаршкова М.А., Деев Л.А и др., 2012; Ting D.S.J. et al., 2021).

Инфекционные заболевания заднего отрезка глаза (эндофтальмиты) имеют несколько меньшую частоту встречаемости и занимают 8-9-е место в структуре глазной инфекционной заболеваемости с частотой встречаемости до 0,5-0,7%. Однако попадание инфекционного агента в витреальную полость более чем в 50% случаев сопровождается необратимым снижением зрительных функций, даже при эффективном этиопатогенетическом лечении. При этом частота энуклеаций глазного яблока может достигать 78%, при контакте интраокулярных структур с флорой с МЛУ. Около 95% пациентов, эффективно пролеченных по поводу вызванного агрессивной микрофлорой инфекционного эндофтальмита, имеют остроту зрения движение руки у лица и ниже (Гундорова Р.А. и др., 1986; Краснов М.Л. и др., 1988; Малюгин Б.Э. и

др., 2010, 2013, 2018; Егоров В.В. и др., 2012; Barry P. et al., 2013; Поздеева Н.А., Фролычев И.А., 2013, 2018; Дроздова Н.А., 2018; Казайкин В.Н. и др., 2017, 2020; Rekas M. et al., 2022; Baudin F. et al., 2022; Bohrani B. et al., 2022).

В основе низких функциональных и анатомических результатов лечения инфекционных заболеваний глаза лежит прогрессирующая МЛУ потенциальных возбудителей инфекционных заболеваний, вне зависимости от механизма развития инфекционного процесса (Hillier R. et al., 2013; Nguyen J. et al., 2016; Kansal V. et al., 2017; Relhan N. et al. 2021; Jeng Ting D. et al. 2019, 2020, 2021; Sisinthu S. et al., 2022 и др.).

В качестве триггера МЛУ выступают факторы внутреннего и внешнего характера. К внутренним факторам относятся мобильные генетические элементы бактерий (плазмиды), выполняющие функцию горизонтального переноса генов, отвечающие за устойчивость к антибиотикам (АБ) и мутационные микроэволюционные изменения в геноипе бактериальной клетки, способные приводить к развитию неуправляемой полирезистентности; образование «кворумов» – аутоиндукторов, обеспечивающих межклеточные взаимодействия; ферментативная «распущенность» патогенной флоры – невозможность инактивации через один фермент; образование биополимерных матриц (биопленок), что детерминирует систему факторов агрессии, инвазии, защиты и приспособления возбудителей инфекции (Read A. al. 2014; Demarco B. et al., 2020).

Внешние факторы включают чрезмерное злоупотребление АБ и их самоназначение (Bartlett J. et al., 2022), неадекватное их назначение медицинскими работниками, в виде субклинических доз, чрезмерно коротких курсов лечения, а иногда назначение их при полном отсутствии показаний к антибиотикотерапии (Viswanathan V. et al., 2021). В терапевтической офтальмологической практике АБ назначаются без должного надзора, например, в качестве средств профилактики при вирусных поражениях глазной поверхности или без проведения дифференциальной диагностики. В офтальмохирургии, в случаях длительной терапии (например, ингибиторами ангиогенеза), пациент использует АБ в до-, интра- и послеоперационном периодах, с ежемесячно повторяющимися циклами. В случаях необходимости использования интравитреального введения АБ (эндофтальмит), препараты вводятся эмпирически, для гарантированного перекрытия всех возможных возбудителей инфекции. Инфекционные язвы роговицы предусматривают стандарт эмпирической терапии, перекрывающий весь спектр возможных возбудителей инфекции. Естественно, совокупность этих факторов способна приводить к необратимым изменениям глазной микробиоты, а в некоторых

случаях – к селекции антибиотико-резистентных штаммов микроорганизмов (Miller D. et al., 2021).

Одним из ключевых факторов в кризисе резистентности и борьбы с ним является экстенсивное применение АБ в сельском хозяйстве. К сожалению, и развитые, и развивающиеся страны используют АБ в качестве добавок в животноводстве и растениеводстве, химической промышленности. Последовательность передачи АБ через цепи питания и контакт формирует патологический резистентный биом у человека.

Более того, фармакологические компании не имеют коммерческой заинтересованности в разработке новых АБ, что спровоцировано колоссальными трудо- и финансовыми затратами, низкой окупаемостью и бюрократическими ограничительными барьерами (Michael C. et al., 2022).

Совокупность вышеописанных факторов формирует каскад негативных функциональных и анатомических результатов лечения бактериальных инфекционных заболеваний в общем и в офтальмологической практике в частности, в этиологии которых доминируют штаммы с МЛУ, что провоцирует практикующих клиницистов исследовать перспективные пути решения глобального «кризиса» антибиотикорезистентности, с точки зрения поиска и активного внедрения эффективных средств лечения инфекционных воспалительных заболеваний бактериальной этиологии.

На сегодняшний день, одним из перспективных направлений в лечении инфекционных заболеваний глаза является разработка терапии с использованием видов квантовых точек (КТ) и конъюгатов на их основе, особенно в отношении штаммов с МЛУ. Подобные исследования в офтальмологии не проводились, однако имеются данные о крайне высокой перспективности этого направления и в смежных медицинских отраслях (Courtney C. et al., 2019; Goodman M. et al., 2020; Khan S. et al., 2024).

Квантовые точки представляют собой полупроводниковые нанокристаллы или углеродные композиты размером несколько нанометров (2-10 нм) с контролируемыми (управляемыми) оптическими и электронными свойствами, за счет изменения их размера, морфологии и покрытия, потенциально адаптированными под офтальмологическую практику.

Область противомикробного воздействия КТ может быть реализована в офтальмологии за счет изменения состава, формы и размера КТ как фотовозбужденного носителя заряда.

Механизм антибактериального действия КТ реализуется за счет их тканевой гиперпроницаемости, обусловленной размерностью, зарядностью, квантово-механическими и размерными эффектами; способности к донации неспаренных электронов под действием источника возбуждения, а также

эффектов Ферстеровского безызлучательного переноса энергии (FRET-эффекта). Неспаренные электроны, отчужденные от КТ, вступают во взаимодействия с вне- и внутриклеточными субстратами, приводя к возмущению окислительно-восстановительного гомеостаза в клеточной среде (микробной клетке) путем управляемого образования супероксидных радикалов и участия в других химических реакциях, требующих электронных взаимодействий (например, реакция окисления железа и серы), разрушая нормальную внутриклеточную окислительно-восстановительную среду, необходимую для нормального функционирования патогенного микроорганизма. Существует два потенциальных пути использования КТ в отношении микрофлоры с МЛУ: один из них – это использование КТ в чистом виде путем фотовозбуждения с образованием супероксидных радикалов, губительно действующих на возбудителя. Второй – комбинация АБ и фотоактивированных КТ для увеличения потенциала активности и безопасности используемых химиотерапевтических агентов. Именно в этом формате – нарушителя электронно-транспортной цепи бактериальной клетки – способны выступать фотосенсибилизированные КТ в офтальмологической практике. Баланс между безопасным воздействием супероксидных радикалов, образованных КТ, на собственные ткани и их синергетическим действием (использование в качестве конъюгата с АБ), достигается за счет подбора типа КТ в соответствующей концентрации (Courtney C. et al., 2016, 2017, 2019; Казайкин В.Н. и др., 2019, 2020, 2021; 2022; 2023; Goodman M. et al. 2018, 2019, 2020).

На основании потенциальной перспективы применения КТ в качестве нового средства лечения инфекционных заболеваний глаза бактериальной этиологии, особенно в случаях множественной лекарственной устойчивости возбудителя, была сформулирована цель диссертационного исследования.

Цель исследования

Улучшение результатов лечения лекарственно резистентных бактериальных инфекций глаза с помощью конъюгатов на основе наночастиц (квантовых точек).

Задачи исследования

1. На основании ретроспективного анализа клинико-функциональных и анатомических результатов лечения бактериальных инфекций глаза доказать их недостаточную эффективность.
2. На основании физико-химических, биологических и фармакологических исследований обосновать возможность применения

квантовых точек и конъюгатов на их основе для лечения антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза.

3. На основании бактериологических методов исследования *in vitro* доказать антибактериальную активность квантовых точек и конъюгатов на их основе.

4. В эксперименте *in vivo* доказать клиническую эффективность лечения антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза с помощью квантовых точек и конъюгатов на их основе.

5. На основании клинических и инструментальных методов исследования в эксперименте *in vivo* доказать анатомическую и функциональную безопасность применения квантовых точек и конъюгатов на их основе в лечении антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза.

6. На основании цитологических и гистоморфологических методов исследования доказать клеточную и тканевую безопасность применения квантовых точек и конъюгатов на их основе в лечении антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза.

7. Разработать требования для создания лекарственного препарата с использованием квантовых точек и конъюгатов на их основе для применения в офтальмологической практике.

8. На основании существующих терапевтических моделей определить место разработанной технологии в системе фармакотерапии антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза.

9. На основании фармакоэкономического анализа обосновать эффективность клинического применения разработанной технологии лечения антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза.

Научная новизна

1. Изучены и определены физико-химические, биологические и фармакологические параметры квантовых точек и конъюгатов на их основе, обосновывающие возможность их использования в офтальмологической практике.

2. Установлена антибактериальная активность *in vitro* исследуемых квантовых точек и конъюгатов на их основе в отношении антибиотикорезистентных (внутрибольничных и амбулаторных) штаммов возбудителей бактериальных инфекций глаза.

3. Предложена концепция создания новых лекарственных препаратов, лежащих в основе разработанной технологии лечения бактериальных инфекций глаза.

4. Исследована и получена доклиническая эффективность разработанной технологии лечения бактериального поражения роговицы и внутренних оболочек глазного яблока, заключающаяся в комбинированном использовании (in uno phialam) квантовых точек и конъюгатов на их основе (КТ+Ванкомицин, КТ+Цефтазидим, КТ+Тобрамицин, КТ+Левифлоксацин), вызванного антибиотикорезистентной грамположительной и грамотрицательной микрофлорой на лабораторных животных.

5. Установлена клеточная, тканевая, анатомическая и функциональная безопасность офтальмологического использования разработанной технологии лечения антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза с помощью цитологических, гистоморфологических, функциональных (электрофизиологических) и клинических методов исследования.

6. Разработаны методы фармакотерапии антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глазного яблока с помощью новой технологии лечения, заключающиеся в дифференцированном подходе на основании клинических проявлений, результатов бактериологического посева и анализа уровня клинического ответа на базовую антиинфекционную терапию.

7. Изучены перспективы клинического применения разработанной технологии лечения антибиотикорезистентных инфекций глазного яблока методом анализа «затраты-эффективность» и сформулированы требования для разработки лекарственного препарата с использованием квантовых точек и их конъюгатов для офтальмологической практики.

Теоретическая и практическая значимость

1. Исследованы и определены характеристики и свойства квантовых точек и конъюгатов на их основе, необходимые для использования в офтальмологической практике, изучены фундаментальные принципы и механизмы их антиинфекционной активности в отношении возбудителей бактериальных инфекций глаза.

2. Исследован *in vitro* спектр антиинфекционной активности квантовых точек и конъюгатов на их основе в отношении различных (антибиотикочувствительных и резистентных) возбудителей бактериальных инфекций глаза (внутрибольничных и амбулаторных штаммов) в условиях фотовозбуждения и без него.

3. Предложена и доклинически исследована новая технология лечения антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза.

4. Изучена клеточная, тканевая, анатомическая и функциональная безопасность офтальмологического использования разработанной технологии

лечения антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глазного яблока у лабораторных животных.

5. Сформулированы требования для разработки лекарственного препарата, определены пути фармакотерапии, проведен фармако-экономический анализ для внедрения разработанной технологии лечения антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глазного яблока.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанная технология лечения антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза с помощью конъюгатов на основе наночастиц, заключающаяся в добавлении к раствору антибиотиков раствора полупроводниковых квантовых точек до получения их концентрации равной 0,01%, позволяет лечить антибиотикорезистентные бактериальные инфекционные заболевания глаза, ранее не поддающиеся эффективной терапии, расширить спектр действия антибиотиков, минимизировать риск селекции антибиотикорезистентных штаммов за счет получения дополнительных механизмов действия – управляемой генерации активных форм кислорода и способности квантовых точек проникать внутрь бактериальной клетки, физически разрушая ее клеточную мембрану.

2. Проведенное клинико-экономическое обоснование внедрения разработанной технологии лечения антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза с помощью конъюгатов на основе наночастиц, заключающееся в исследовании клеточной, тканевой, функциональной, анатомической безопасности, проведении фармакоэкономического анализа, позволяет получить экономически эффективное лекарственное средство с высоким профилем безопасности.

Внедрение в практику

Результаты исследования внедрены в научную и педагогическую деятельность головного учреждения и филиалов ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, кафедры офтальмологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, кафедры глазных болезней ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, центра офтальмологии ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова» Минздрава

России. Результаты исследования явились теоретической основой для разработки нового класса лекарственных соединений, используемых в комплексном лечении антибиотикорезистентных бактериальных инфекций переднего и заднего сегмента глазного яблока.

Апробация работы

Материалы и основные положения диссертации представлены и обсуждены на Международной XII International Scientific Conference of Black Sea Ophthalmological Society «Innovative Ophthalmology», «BSOS-Sochi 2014» – (Сочи, 2014); II Поволжской молодежной научно-практической офтальмологической конференции "ОКО 2014" (Уфа, 2014); Региональной конференции «Актуальные вопросы диагностики и лечения воспалительной патологии глаз» (Екатеринбург, 2015); III Всероссийской молодежной научно-практической офтальмологической конференции с участием представителей стран ШОС (Уфа, 2015); VII Международной Евро-Азиатской конференции по офтальмохирургии (Екатеринбург, 2015); VI Международной конференции по офтальмохирургии (Уфа, 2015); XXIII Научно-практической конференции офтальмологов Екатеринбургского центра МНТК «Микрохирургия глаза» (Екатеринбург, 2015); IV Всероссийской молодежной научно-практической конференции «ОКО 2016» (Уфа, 2015); Региональной Научно-практической конференции «Актуальные вопросы офтальмологии» (Екатеринбург, 2017); XV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения» (Москва, 2018); XXXI Международном конгрессе немецких офтальмохирургов (Нюрнберг, 2018); XXVI научно-практической конференции офтальмологов Екатеринбургского центра МНТК «Микрохирургия глаза» (Екатеринбург, 2018); Научно-практической конференции офтальмологов Свердловской области «Воспалительная патология органа зрения» (Екатеринбург, 2019); 17-й Всероссийской Научно-практической конференции с международным участием «Современные технологии витреоретинальной патологии» (Сочи, 2019); Всероссийском 20-й конгрессе с международным участием «Современные технологии катарактальной, роговичной и рефракционной хирургии» (Москва, 2019); XXVIII Научно-практической конференции офтальмологов Екатеринбургского Центра МНТК «Микрохирургия глаза» (Екатеринбург, 2020); Научно-практической конференции офтальмологов Свердловской области «Воспалительная патология органа зрения» (Екатеринбург, 2021); Всероссийской конференции «Воспаление глаза» (Москва, 2021); XXIX Научно-практической конференции офтальмологов (Екатеринбург, 2021); Научно-практической конференции офтальмологов Свердловской области

«Воспалительная патология органа зрения» (Екатеринбург, 2022); 19-й Всероссийской научно-практической конференция с международным участием «Современные технологии лечения витреоретинальной патологии». (Уфа, 2022); Межрегиональной конференция «Актуальные вопросы офтальмологии» (Челябинск, 2022); XII Международной конференции по офтальмологии ВОСТОК-ЗАПАД (Уфа, 2022); II Всероссийской конференции с международным участием «Воспаление глаза» (Москва, 2022); Региональной конференции «Актуальные вопросы офтальмологии», (Ханты-Мансийск, 2022); 11-м витреоретинальном собрании «Креатив и лайфхаки витреоретинальной хирургии» (Ташкент, 2022); Региональной научно-практической конференции офтальмологов Свердловской области (Екатеринбург, 2023); 20-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные технологии лечения витреоретинальной патологии» (Казань, 2023); Всероссийской научной юбилейной конференции «205 лет основания кафедры офтальмологии профессора В.В. Волкова» (Санкт-Петербург, 2023); Научно-практической межрегиональной конференции «Южно-Уральская офтальмологическая панорама» (Челябинск, 2023), XIII Съезд Общества офтальмологов России (Москва, 2024).

Публикации

По теме диссертационного исследования опубликовано 23 статьи, из них – 22 в рецензируемых научных журналах, включенных Высшей аттестационной комиссией Минобрнауки РФ в список изданий, рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертационных работ. Получено 3 патента на изобретения РФ, свидетельство о регистрации базы данных.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 348 страницах компьютерного текста, содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, 6 глав собственного исследования и его результатов, заключение, выводы, практические рекомендации. Текст диссертации иллюстрирован 134 рисунками и 57 таблицами. Библиографический указатель содержит 266 публикаций, из них 38 отечественных и 228 зарубежных источников.

Работа выполнена в Уральском государственном медицинском университете и в АО «Екатеринбургский центр МНТК «Микрохирургия

глаза». Научные консультанты – доктор медицинских наук Казайкин Виктор Николаевич, доктор медицинских наук, профессор Омеляновский Виталий Владимирович.

Исследовательские базы, задействованные в диссертационном исследовании:

- Кафедра офтальмологии Уральского государственного медицинского университета, г. Екатеринбург (клинико-диагностическая база);
- АО «Екатеринбургский центр МНТК «Микрохирургия глаза», г. Екатеринбург (клинико-диагностическая база);
- ФГУП «НИИ прикладной акустики», г. Дубна, Московская область (подбор и синтез квантовых точек по техническому заданию для офтальмологического применения);
- Университетский научно-образовательный центр «Наноматериалы и нанотехнологии» (НОЦ НАНОТЕХ) ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург (исследование биологических, физико-химических, фармакологических и люминесцентных свойств квантовых точек и конъюгатов на их основе);
- ГАУЗ СО «Клинико-диагностический центр», г. Екатеринбург (мультиמודальные бактериологические исследования с антибиотикорезистентной микрофлорой);
- Ветеринарная клиника ООО «Здоровье животных», г. Екатеринбург (часть экспериментального этапа исследования с участием лабораторных животных, требующих наркоза и круглосуточного наблюдения ветеринара);
- Уральский научно-исследовательский институт Фтизиопульмонологии, филиал ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России, г. Екатеринбург (основной виварий для лабораторных животных, гистоморфологический анализ тканей);
- ФБУ науки «Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург (исследование острой и хронической цитотоксичности квантовых точек на культуре клеток).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Дизайн исследования

Работа содержит пять разделов исследований: ретроспективные, фундаментальные, клинико-лабораторные, цитогистоморфологические и фармакоэкономические. На Рисунке 1 представлен дизайн исследования. Последовательная структура проведенного исследования приведена ниже.



Рисунок 1 – Дизайн диссертационного исследования

Материалы и методы исследования

Ретроспективные исследования

В основу ретроспективного анализа клинико-функциональных результатов лечения бактериальных инфекций глаза вошли случаи кератитов (с 2017 по 2023 г.) и острых послеоперационных эндофтальмитов (с 2002 по 2023 г.), зарегистрированных в АО «Екатеринбургский центр МНТК «Микрохирургия глаза». Анализ медицинской документации осуществлялся путем прямой выборки медицинских карт, а также электронного анализа медицинской документации из медицинской информационной системы «Ариадна», введенной в документооборот организации с 2020 года.

Критерии включения в выборку:

- впервые выявленные (не леченные ранее) и направленные из других медицинских организаций осложнённые случаи острого

воспалительного процесса переднего отрезка глаза, с формулировкой основного диагноза: кератит;

- впервые выявленные (не леченные ранее) признаки острого воспалительного процесса заднего отрезка глаза, с формулировкой диагноза: эндофтальмит (в т.ч. подозрение)/острый иридоциклит/задний увеит).

Критерии исключения:

- пациенты, которым ранее проводилось медикаментозное или хирургическое лечение по поводу вышеописанных заболеваний (*исключение: случаи кератитов, направленных из других организаций);

- пациенты со сроком заболевания более 6 недель для воспалительных заболеваний заднего отрезка глаза;

- отсутствие факта взятия бактериологического посева с тестом проведения антибиотикочувствительности.

Анализируемые признаки:

- количество случаев;

- анатомо-функциональное состояние зрительного анализатора при поступлении/выписке из лечебного учреждения (клинико-анатомическое состояние глаза, зрительные функции);

- результаты бактериологического посева;

- результаты тестов антибиотикочувствительности (по градации: чувствителен к двум и более АБ, чувствителен к одному АБ, не чувствителен к АБ);

- анализ зависимости функциональных и анатомических результатов лечения от вида возбудителя и его чувствительности к проводимой антибактериальной терапии.

Фундаментальные исследования

Фундаментальной основой диссертационного исследования явилось изучение физико-химических, биологических и фармакологических характеристик КТ и конъюгатов на их основе, которые явились субстратом для последующего научного обоснования применения новой технологии лечения антибиотикорезистентных офтальмологических инфекционных заболеваний. В этой связи, **первый этап** исследования был посвящен оптимальному подбору и синтезу КТ для офтальмологического применения на основании технического задания, в основу которого легла совокупность физических, химических, спектральных и фармакологических характеристик КТ, максимально подходящих к физиологическим параметрам глазного яблока, сформированные автором диссертации. Производственной базой для синтеза КТ выступил ФГУП «Научно-исследовательский институт прикладной

акустики», г. Дубна, Московская область. Технические требования, предъявляемые к КТ, представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Технические требования, предъявляемые к КТ для потенциального офтальмологического применения

Состав	Металл, полупроводник
Предельный диаметр	10 нм (2-3 оболочки)
Растворитель	Вода
Квантовый выход	Не более 0.5
Спектр поглощения	Широкий
Спектр эмиссии	Узкий
Функционализация	-COOH, -NH ₂
Дополнительные свойства	Образование АФК

Все синтезируемые КТ производились восходящим химическим методом. В качестве реактивов для синтеза КТ использовались: октадецен (Fluka, 90%), селен (Merck, 99%), теллур (Aldrich, 99,8%), олеиламин (90%, Sigma), метанол (HPLC), триоктилфосфин (Sigma, 90%), ацетат цинка (Sigma, 99%), трис-(диэтиламино)фосфин (Aldrich, 97%), 3-меркаптопропионовая кислота (Enamine, 95%). Спектры поглощения синтезируемых образцов измеряли с шагом 1 нм на спектрофотометре UV-Vis-NIR Cary 5000 (Varian, Австралия). Спектры фотолюминесценции измеряли на спектрофлуориметре HORIBA Fluorolog-3 (Sceintific, США).

Второй этап исследования заключался в разработке методики, исследовании возможности и скорости генерации активных форм кислорода при облучении КТ светом в видимом диапазоне длин волн и при изменении концентрации и pH среды. В качестве маркера формирования супероксидного радикала, обладающего восстановительными свойствами, был исследован цитохром С (CytC). Поскольку ряды активных форм кислорода (АФК) обладают и окислительными свойствами (гидроксильный радикал, синглетный кислород и др.), в дополнение к данному методу была изучена реакция окисления дигидрородамина.

В качестве материалов исследовались следующие типы КТ, в сочетании со вспомогательными индикаторами реакций:

- 1) КТ CdTe/Cd 710 МРА,
- 2) КТ InP/ZnSe/ZnS 650 МРА,
- 3) КТ Ag(10%):InP/ZnS МРА,
- 4) Родамин 6G, (Acros, 99%),

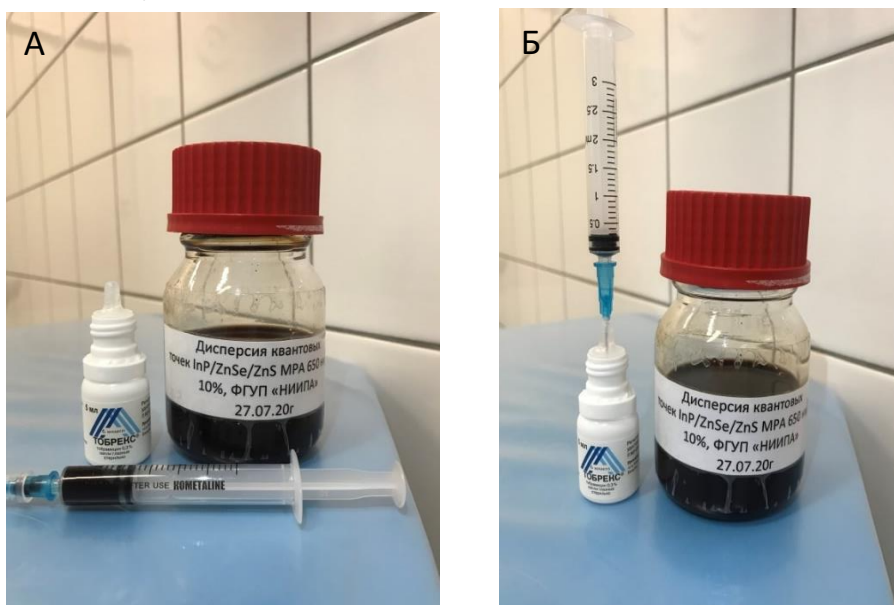
- 5) Натрия борогидрид, (Scharlau, 95%),
- 6) Цитохром С, (CytC, ООО «Самсон-Мед»).

Регистрацию спектров флуоресценции и поглощения проводили с использованием спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian, Австралия) и спектрофотометра V-630 (Jasco, США). Облучение проводили с использованием светодиодной лампы 8*3Вт с длиной волны 450 нм с расстояния 80 мм от образца в 1 см кварцевой кювете (объем 3 мл). Получение дигидрородамина проводили путем восстановления родамина 6G борогидридом натрия.

На **третьем этапе** исследования изучалось физическое взаимодействие и фармакокинетика КТ с бактериальной клеткой, методами сканирующей/растровой (СЭМ/РЭМ) и просвечивающей (ПЭМ) электронной микроскопии. Исследования выполнялись на приборной базе университетского научно-образовательного центра «Наноматериалы и нанотехнологии» УрФУ и лаборатории электронной микроскопии сверхвысокого разрешения УРФУ, г. Екатеринбург. В качестве объекта исследования брался водный раствор КТ InP/ZnSe/ZnS 0,1 мл в концентрации 0,001% и культура метициллин-резистентного золотистого стафилококка (МРЗС) в мутности 0.5 по стандарту МакФарланда (McF), путем ее взятия непосредственно с кровяного агара в объеме 0,1 мл. Культура МРЗС исследовалась в чистом виде, а также после смешивания с раствором КТ в равных пропорциях во временных интервалах через 1 мин, 5 мин, 10 мин, 30 мин, 60 и 120 минут соответственно, для оценки особенностей фармакокинетики. Для проведения РЭМ использовался электронный микроскоп Sigma VP, Carl Zeiss (Германия) в режиме высокого вакуума. Исследуемые образцы наносились на углеродную ленту перед помещением в камеру микроскопа. Для ПЭМ применялся микроскоп JEM-2100 (Япония). Во всех случаях перед исследованиями на образцы наносилась аморфная углеродная пленка. Образцы закреплялись на держателях и помещались в камеру электронного микроскопа.

Четвертый этап диссертационной работы посвящен непосредственному синтезу и исследованию конъюгатов на основе КТ и АБ, используемых в офтальмологической практике. В качестве АБ, используемых в терапии инфекционных заболеваний переднего и заднего отрезков глаза, были взяты Ванкомицин 1000 мг, Цефтазидим 1000 мг, Левофлоксацин 5 мл, Тобрамицин 5 мл. В качестве КТ были использованы InP/ZnSe/ZnS и CdTe/Cd, как наиболее реакционногенные субстанции, исходя из данных, полученных в результате возможности образования АФК. Растворы исследуемых АБ и КТ смешивались в различных концентрациях (от 10 до 0,001%) и равных

объемных соотношениях. На завершающем этапе выполнялось центрифугирование полученных растворов на протяжении 3 мин. в препаративной ультрацентрифуге при температуре 37°C. Аттестация абсорбционных и фотолюминесцентных характеристик КТ в различных концентрациях, конъюгатов на основе КТ и АБ выполнялась на приборной базе университетского научно-образовательного центра «Наноматериалы и нанотехнологии» (НОЦ НАНОТЕХ) УрФУ. Спектры оптической плотности (ОП) образцов регистрировались на спектрофотометре Shimadzu UV-2450 (Япония) при комнатной температуре. Исследуемые образцы помещались в кварцевую кювету с длиной оптического пути 1 см. Шаг сканирования составлял 0,5 нм. Спектры флуоресценции регистрировались на флуоресцентном спектрометре Perkin Elmer LS55 (Analitical Science, США) при комнатной температуре. Исследуемые образцы помещались в кварцевый капилляр с внутренним диаметром 1 мм. Скорость сканирования составляла 120 нм/мин, спектральная ширина щелей возбуждающего и регистрирующего монохроматоров – 10 нм. Пример подготовки конъюгата на основе АБ и КТ представлен на Рисунке 2.



А – Раствор КТ располагается в шприце

Б – раствор КТ в процессе введения во флакон с АБ

Рисунок 2 – Процесс внесения нативного (10%) раствора КТ InP/ZnSe/ZnS 650 в раствор Тобрамицина 5 мл

На **пятом этапе** диссертационной работы выполнялось изучение влияния температурных изменений на клиническую активность КТ. В качестве объекта исследования использовались КТ InP/ZnSe/ZnS 650 (n=20). Температурные особенности фотолюминесценции исследовались в НОЦ «Наноматериалы и нанотехнологии» Уральского федерального университета,

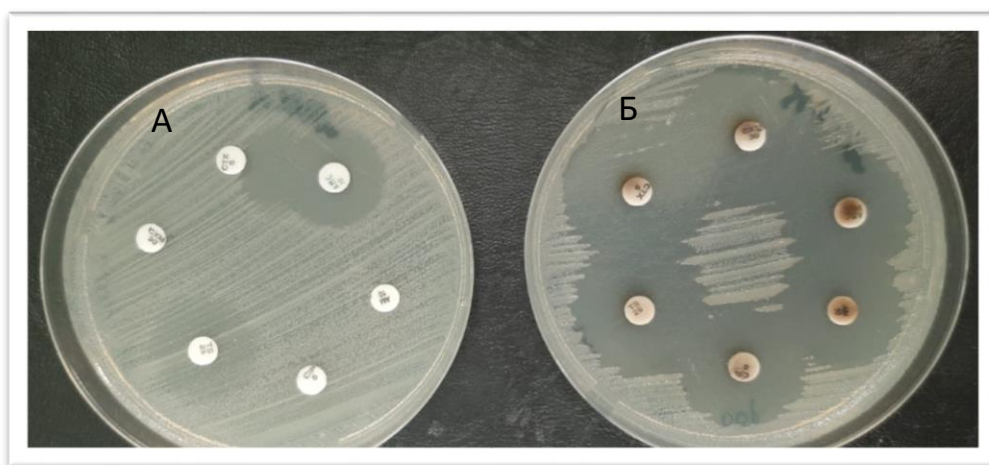
г. Екатеринбург, на флуоресцентном спектрометре Perkin Elmer LS55 (Analitical Science, США) с оригинальным компактным нагревателем. Спектры возбуждения и свечения измерялись со скоростью сканирования 60 нм/мин при ширине щелей возбуждающего и регистрирующего монохроматоров 5 нм. Температура образцов варьировалась в диапазоне от 22 до 50°C. Образец готовился следующим образом: капля коллоидного раствора КТ InP/ZnSe/ZnS 650 в физиологическом растворе концентрации 17 мг/мл наносилась на серебряную подложку, выдерживалась в течение 1 часа до полного высыхания при комнатной температуре.

Шестой этап был посвящен изучению влияния биологического окружения на клиническую активность КТ. В качестве образцов для исследования были взяты КТ типа InP/ZnSe/ZnS 650 (n=10) и антитела к вирусу H1N1 (n=10). Образцы представляли собой 0,01% коллоидные растворы КТ InP/ZnSe/ZnS 650 в физиологическом растворе в объеме 0,5 мл и коллоидные растворы вышеописанных КТ с антителами к вирусу гриппа H1N1 в соответствующих объемных отношениях. Образцы наливались в кварцевую пробирку с внешним диаметром 4 мм и внутренним диаметром 2,5 мм. В качестве растворителя использовался физиологический раствор. Температурные особенности ФЛ стандартно исследовались на флуоресцентном спектрометре Perkin Elmer LS55 (Analitical Science, США). Спектры флуоресценции измерялись со скоростью сканирования 120 нм/мин при ширине щелей возбуждающего и регистрирующего монохроматоров 5 и 10 нм. Все измерения проводились при комнатной температуре.

На завершающем **седьмом этапе** фундаментального раздела диссертационного исследования изучалась возможность стерилизации КТ с помощью трековых мембран (ТМ) для офтальмологического использования. В качестве объекта исследования, были взяты нестерильные КТ Ag(10%):InP/ZnS МРА, представляющие собой 2-оболочечную структуру, диаметром $5 \pm 1,5$ нм, что явилось основополагающим фактором, т.к. это КТ, имеющие наименьший диаметр. В качестве трековой мембраны использовалась ТМ из политетрафторэтилена (PTFE) с диаметром пор 50 нм. Серия растворов КТ (n=20) в разведении 1/10 к сбалансированному солевому раствору под давлением пропусклась через трековую мембрану, пропущенную через сочленение между подыгольным конусом и дистальной частью канюли шприца с последующим бактериологическим посевом в лаборатории клинической микробиологии ГБУЗ СШ «СОКБ № 1», г. Екатеринбург. В качестве контроля (n=20) растворы КТ вышеописанным способом пропускались через пустую систему сочленения шприца.

Клинико-лабораторные исследования

На данном этапе диссертационного исследования выполнялось изучение антибактериальной активности КТ и конъюгатов на их основе в отношении антибиотикорезистентных возбудителей инфекционных офтальмологических заболеваний *in vitro*. В качестве КТ использовались 3 вида искусственных флуорофоров: тип 1 – коллоидный раствор КТ CdTe/Cd МРА 710 10% масс., тип 2 – коллоидный раствор КТ InP/ZnSe/ZnS 650 10% масс., тип 3 – коллоидный Ag(10%):InP/ZnS МРА 10% масс. Лабораторный этап исследования проводился на базе ГАУЗ СО «Клинико-диагностический центр», г. Екатеринбург». Диффузионный метод определения чувствительности был использован в качестве эталона. В исследование были включены «музейные» и внутрибольничные штаммы микроорганизмов, способные вызывать офтальмологические заболевания переднего и заднего отрезков глаза чаще всего. Культуры микроорганизмов инкубировали в условиях термостата при 35°C 18 часов (в темноте и под источником фотовозбуждения). Для грамположительных микроорганизмов (*enterococcus faecalis*, *staphylococcus aureus*, *staphylococcus epidermidis*) использовали диски с Ванкомицином (30 мг) и Левофлоксацином (5 мг). Для грамотрицательных микроорганизмов (*escherichia coli*, *pseudomonas aeruginosa*, *klebsiella pneumoniae*) использовали диски с Цефтазидимом (10 мг) и Цефотаксимом (5 мг). На каждый диск наносили по 6 мкл растворов 3 типов КТ в разведениях: 1:10, 1:100, 1:1000 (для образования конъюгатов КТ/АБ). В качестве контроля ставили чистый диск, без нанесения раствора (б/р) (Рисунок 3).



А – ЗЗР без нанесения КТ

Б – ЗЗР с нанесенными КТ CdTe/Cd МРА 710

Рисунок 3 – Пример формирования ЗЗР

Анализ эффективной зоны задержки роста (ЗЗР) (чувствительность к АБ) проводился на автоматическом бактериологическом анализаторе «ADAGIO» (Bio-rad, Франция). Число последовательных измерений составило 20 ($n=20$). Для определения эффективной ЗЗР был введен показатель эффективности динамики изменения ЗЗР по степеням в мм: до 2 мм – умеренная эффективность динамики, 2-5 – высокая эффективность, более 5 – очень высокая. В качестве источника фотовозбуждения КТ (спектр излучения источника соответствовал спектру поглощения КТ) использовалась светодиодная лента, подключенная к аккумулятору бесперебойного питания, помещаемая в термостат.

Доклинические исследования

На этапе доклинических исследований выполнялось моделирование и разработка экспериментального лечения инфекционного поражения роговицы и внутренних оболочек глазного яблока, вызванного антибиотикорезистентной Gr^- и Gr^+ микрофлорой. Все этапы экспериментального исследования с участием лабораторных животных проводились согласно принципам этического кодекса, «Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза», и включали в себя контроль суточного потребления корма и воды, суточное мониторингирование температуры тела, ветеринарное сопровождение лабораторных животных.

При моделировании экспериментального лечения инфекционного поражения роговицы, вызванного антибиотикорезистентной Gr^- микрофлорой, объектом исследования явились лабораторные Новозеландские кролики ($n=20$) – 10 женских особей, 10 мужских. Возраст животных варьировал от 3,5 до 4,5 месяцев ($3,9 \pm 0,6$), вес – от 3,5 до 4,2 кг ($3,8 \pm 0,4$). На правых глазах животных инициировался бактериальный кератит, путем стандартизированного хирургического внесения культуры внутрибольничного штамма синегнойной палочки, выделенной из клинического материала ГАУЗ СО «Клинико-диагностический центр», г. Екатеринбург (плотность 0,5 по стандарту McF и содержащий $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл *Ps. Aeruginosa*, с отсутствием чувствительности к аминогликозидам и цефалоспорином, ЗЗР не превышала 6 и 8 мм соответственно).

После процедуры внесения инокулюма животные рандомизировались на 2 группы по 10 кроликов в каждой. Первой группе лабораторных животных после манифестации клинической картины микробного кератита планировалось проведение лечения с помощью инстилляций глазных капель Тобрамицин каждые 2 часа (раствор Т) на протяжении 1 недели. Кролики второй группы должны были получать инстилляции комплекса КТ InP/ZnSe/ZnS 650 и Тобрамицина (комплекс КТ/Т) в том же режиме.

При моделировании экспериментального лечения инфекционного поражения роговицы, вызванного антибиотикорезистентной Gr^+ микрофлорой, были взяты 20 самцов (20 глаз) Новозеландских кроликов, весом от 3,0 до 3,9 кг (в среднем $3,41 \pm 0,6$), в возрасте от 2,8 до 3,5 месяцев (в среднем $2,95 \pm 0,36$). На правых глазах лабораторных животных производилась индукция бактериального кератита, путем введения госпитального штамма *S.Aureus* (№ 2548, 33Р к Левофлоксацину 7 мм) выделенного из зева на территории ГАУЗ СО «Клинико-диагностический центр», г. Екатеринбург, в строму роговицы с помощью микрохирургического ножа, по вышеописанной методике.

После манифестации клинической картины бактериального кератита кролики первой группы получали инстилляции каплей Левофлоксацин в конъюнктивальный мешок каждые 2 часа на протяжении 7 дней, кролики 2 группы, придерживались аналогичной схемы лечения и получали инстилляции конъюгата КТ CdTe/Cd МРА 710 и Левофлоксацина.

В качестве методов динамического наблюдения использовались: клинический осмотр, фоторегистрация с окрашиванием переднего отрезка флуоресцеином с помощью фотощелевой лампы (EyeSuite Imaging Module IM900, США), оптическая когерентная томография переднего отрезка с помощью оптического когерентного томографа (OptoVue Solix, США), выполненные на базе АО ЕЦ МНТК «Микрохирургия глаза», г. Екатеринбург.

При мониторинге и статистической обработке клинической реакции на лечение проводился балльный анализ, по шкале от 1 до 5, где 1 – минимальные проявления, 5 – максимальные проявления:

- 1) динамика периметра стромального инфильтрата;
- 2) динамика плотности стромального инфильтрата;
- 3) динамика стромального отека и эндотелиальной воспалительной реакции;
- 4) наличие воспалительных клеток в передней камере;
- 5) динамика реэпителизации роговицы, отсутствие или прекращение процессов истончения роговицы.

При моделировании экспериментального лечения инфекционного поражения внутренних оболочек глазного яблока, вызванного антибиотикорезистентной Gr^- микрофлорой, в качестве объекта исследования использовались лабораторные Новозеландские кролики ($n=27$), мужского пола в возрасте от 3,0 до 3,5 месяцев (в среднем $3,2 \pm 1,5$), весом от 3,5 до 4,0 кг (в среднем $3,7 \pm 0,34$). В качестве индуктора воспалительной реакции всем лабораторным животным ($n=27$) в правый глаз была произведена интравитреальная инъекция мультирезистентного штамма синегнойной

палочки в объеме 0,05 мл мутностью 0,5 по McF, выделенной от пациента с септическим поражением на базе ГАУЗ СО «Клинико-диагностический центр», г. Екатеринбург.

После индукции патологического процесса и постановки диагноза – острый бактериальный эндофтальмит, животным производились лечебные интравитреальные инъекции (ИВИ) 0,1 мл лекарственных форм в соответствии с распределением по следующим группам, 3 кролика в каждой:

- 1-я группа (n=3) – ИВИ раствора Ag(10%):InP/ZnS МРА 0.1 мл в стандартной 10% концентрации;
- 2-я группа (n=3) – ИВИ раствора Ag(10%):InP/ZnS МРА в 100-кратном разведении (0,1%);
- 3-я группа (n=3) – ИВИ раствора Ag(10%):InP/ZnS МРА в 1000-кратном разведении (0,01%);
- 4-я группа (n=3) – ИВИ раствора Ag(10%):InP/ZnS МРА 0,05 мл в стандартной 10% концентрации, в сочетании 2,25 мг/0,05 мл Цефтазидима (стандартного АБ, имеющего потенциальную активность в отношении Гр- микрофлоры, к которой относится синегнойная инфекция) – Конъюгат №1;
- 5-я группа (n=3) – ИВИ раствора Ag(10%):InP/ZnS МРА 0,05 мл в 100 кратном разведении (0,1%), в сочетании 2,25 мг/0,05 мл Цефтазидима – Конъюгат №2;
- 6-я группа (n=3) – ИВИ раствора Ag(10%):InP/ZnS МРА 0,05 мл в 1000 кратном разведении (0,01%), в сочетании 2,25 мг/0,05 мл Цефтазидима – Конъюгат №3;
- 7-, 8-, 9-я группы (n=3) – получали интравитреальную инъекцию 2,25 мг/0,1 мл Цефтазидима, в качестве контроля.

При моделировании экспериментального лечения инфекционного поражения внутренних оболочек глазного яблока, вызванного антибиотикорезистентной Гр⁺ микрофлорой, объектом исследования явились лабораторные Новозеландские кролики (n=20) – 14 особей мужского пола, 6 особей женского. Возраст животных варьировал от 4,0 до 4,5 месяцев (в среднем $4,2 \pm 0,5$); вес от 3,5 до 4,1 кг (в среднем $3,7 \pm 1,21$). В качестве индуктора воспаления была взята культура внутрибольничного штамма МРЗС с зоной задержки роста к гликопептидам диско-диффузионным методом в 8 мм (не чувствителен к Ванкомицину), выделенной из клинического материала ГАУЗ СО «Клинико-диагностический центр», г. Екатеринбург. После индукции патологического процесса животные случайно были разделены на 2 группы, по 10 кроликов в каждой. В качестве антиинфекционных агентов кроликам первой группы было выполнено интравитреальное введение конъюгата на основе 1 мг/0,05 мл Ванкомицина в сочетании с 0,01%/0,05 мл

раствором КТ InP/ZnSe/ZnS 650. Кролики второй группы получали ИВИ 1 мг/0,1 мл Ванкомицина.

Динамическое наблюдение за течением клинического процесса производилось ежедневно на протяжении 1 недели, посредством фоторегистрации переднего отрезка, ультразвуковой сонографии (УЗИ).

При мониторинге и статистической обработке клинической реакции на лечение анализировались параметры по шкале от 1 до 5, где 1 – низкая динамика, 5 – высокая:

- 1) динамика резорбции гипопиона;
- 2) наличие воспалительных клеток в передней камере;
- 3) динамика регресса патологической взвеси в витреальной полости;
- 4) динамика инволюции патологической неоваскуляризации радужной оболочки;
- 5) динамика реэпителизации роговицы, отсутствие или прекращение процессов истончения роговицы, уменьшение отека роговицы.

Математическая обработка

На доклиническом этапе выполнялась математическая обработка данных. Для каждого анализируемого признака выводился показатель динамики обратного развития симптомов

$$k_i^n = \frac{1}{9} \sum_{j=1}^9 M_{ij}^n, \quad i = 1 \div 5, \quad n = 1 \div 3,$$

где M_{ij}^n – балл состояния i -го признака у j -го кролика, индекс n нумерует соответствующий метод лечения.

Согласно этому показателю, методы, имеющие показатели от 4 до 5, можно характеризовать как эффективные; методы, имеющие показатели от 1 до 3, – низкоэффективные и умеренно эффективные соответственно.

Также, для каждого метода лечения выводился показатель эффективности метода лечения

$$K^n = \frac{1}{5} \sum_{i=1}^5 k_i^n, \quad n = 1 \div 3.$$

Анатомическая и функциональная безопасность

В качестве клинического материала в группу исследования вошло 24 самца (48 глаз) Новозеландских кроликов, весом от 3,0 до 3,8 кг (в среднем $3,45 \pm 0,28$), в возрасте от 2,8 до 3,5 месяцев (в среднем $3,1 \pm 0,42$). Кролики были разделены на 6 групп (по 4 кролика в каждой). В правый глаз животных интравитреально вводились растворы КТ CdTe/Cd МРА 710 в концентрациях от 10 до 0,01%; АБ – 1 мг/0,1 мл Ванкомицина (раствор В), 2,25 мг/0,1 мл

Цефтазидима (раствор Ц), а также конъюгаты на их основе; левый глаз служил контролем. Всем животным за 1 час до интравитреального введения растворов и через одну неделю после, на обоих глазах выполнялись: фоторегистрация переднего отрезка; оптическая когерентная томография (ОКТ) заднего и переднего отрезков, на приборе Optovue RTVue-100 (США); УЗИ на приборе Tomey UD-8000 (Япония) и электрофизиологическое исследование (ЭФИ) на приборе Tomey EP-1000 (Япония), с предварительным получением условно-нормального распределения значений электроретинограммы (ЭРГ).

Клеточная и тканевая безопасность

Тканевая безопасность исследовалась посредством индукции воспалительной реакции лабораторным животным (n=27), путем интравитреальной инъекции в правый глаз мультirezистентной синегнойной палочки в объеме 0,05 мл в мутностью 0,5 McF, с последующим проведением терапии растворами КТ Ag(10%):InP/ZnS МРА в концентрациях от 10 до 0,01%; АБ – 2,25 мг/0,1 мл Цефтазидима (раствор Ц), а также конъюгатами на их основе. Через 1 неделю динамического наблюдения всем животным производилась энуклеация правых глазных яблок, в условиях стерильной операционной под наркозом. Энуклеированные глазные яблоки были помещены в 10% раствор формалина, интраокулярно были заполнены 5% раствором формалина и отправлены на гистоморфологическое исследование в патологоанатомическое отделение Уральского научно-исследовательского института Фтизиопульмонологии – филиала ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России. Микроскопирование осуществлялось при помощи с микроскопа Olympus CX-41 (Германия). При микрофотографировании использовалась камера Olympus Soft Imaging Solution GMBH, Model LC20 (Германия), а также компьютерная программа LC-Micro (5.2).

Клеточная безопасность исследовалась посредством комплексной оценки цитотоксичности (морфология и жизнеспособность клеток) на культуре клеток легких эмбриона человека ЛЭЧ-4(81), путем определения степени цитотоксичности квантовых точек CdTe/Cd МРА 710 (КТ1), Ag (10%) InP/ZnS МРА 710 (КТ2), InP/ZnSe/ZnS 650 МРА (КТ3) на нефиксированной культуре ЛЭЧ-4(81) при малом увеличении микроскопа и при помощи МТТ-теста в различных концентрациях. По полученным результатам рассчитывался индекс цитотоксичности (IC) по формуле:

$$IC = \frac{ОП_k - ОП_o}{ОП_k} \times 100\%$$

где ОП_к – оптическая плотность раствора формазана контрольной группы;
ОП_о – оптическая плотность раствора формазана опытной группы.

На основании полученных данных рассчитывался показатель IC50 – концентрация квантовых точек, вызывающая 50%-ное ингибирование роста клеточной культуры. Исследования проводилось в ФБУ «Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, в лаборатории клеточных культур (группа I) и респираторных вирусных инфекций (группа II).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием компьютерных программ «Microsoft Excel» и «SPSS Statistics 17.0». Для оценки значимости различий между опытными и контрольной группами (в связи с ненормальностью распределения) использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. При вероятности ошибки (p) $\leq 0,05$ различия считали статистически значимыми.

Клинико-фармакологические исследования

В основу разработки и оценки возможности применения методов фармакотерапии антибиотикорезистентных инфекций глазного яблока на основании новой технологии лечения были положены современные данные обзора литературы, результаты собственных исследований в области физико-химических и фармакологических характеристик наночастиц и конъюгатов на их основе, результаты исследований, полученных в ходе моделирования резистентных к антибактериальной терапии инфекционных поражений глазного яблока Gr^+ и Gr^- микрофлорой. Алгоритмы изложены и обоснованы в результатах диссертационного исследования в виде блок-схем.

Фармакоэкономическое обоснование перспективы клинического применения новой технологии лечения антибиотикорезистентных инфекций глазного яблока было выполнено посредством фармакоэкономического моделирования, методом анализа «затраты-эффективность» у пациентов с антибиотикорезистентной внутриглазной инфекцией и антибиотикорезистентной инфекцией переднего отрезка глаза на основании ретроспективного анализа клинических случаев острых бактериальных послеоперационных эндофтальмитов ($n=100$) и бактериальных кератитов ($n=100$), зарегистрированных в АО «Екатеринбургский центр МНТК «Микрохирургия глаза» с 2002 по 2023 год. В качестве контрольной группы использовалась модель лечения указанных нозологий посредством новой разработанной технологии лечения. В ходе моделирования производилось построение модели «древа решений» с расчётом инкрементного показателя (ICER), на основании тарифов на оказание услуг в рамках территориальной программы государственных гарантий (ТПГГ) Министерства Здравоохранения Свердловской области на 2023 год, затрат медицинской

организации (МО) на услуги – планово-экономический отдел АО «Екатеринбургский центр МНТК «Микрохирургия глаза» от 01/2023, а также расчета стоимости «новой» технологии лечения – договор на поставку КТ № 223/2/31, Научно-исследовательский институт прикладной акустики, г. Дубна, Московская область.

В основу формирования требований для разработки лекарственного препарата с использованием КТ и конъюгатов на их основе для применения в офтальмологической практике были положены: ориентированность на офтальмопатологию, эффективность, безопасность, простота изготовления, простота использования, экономическая обоснованность.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

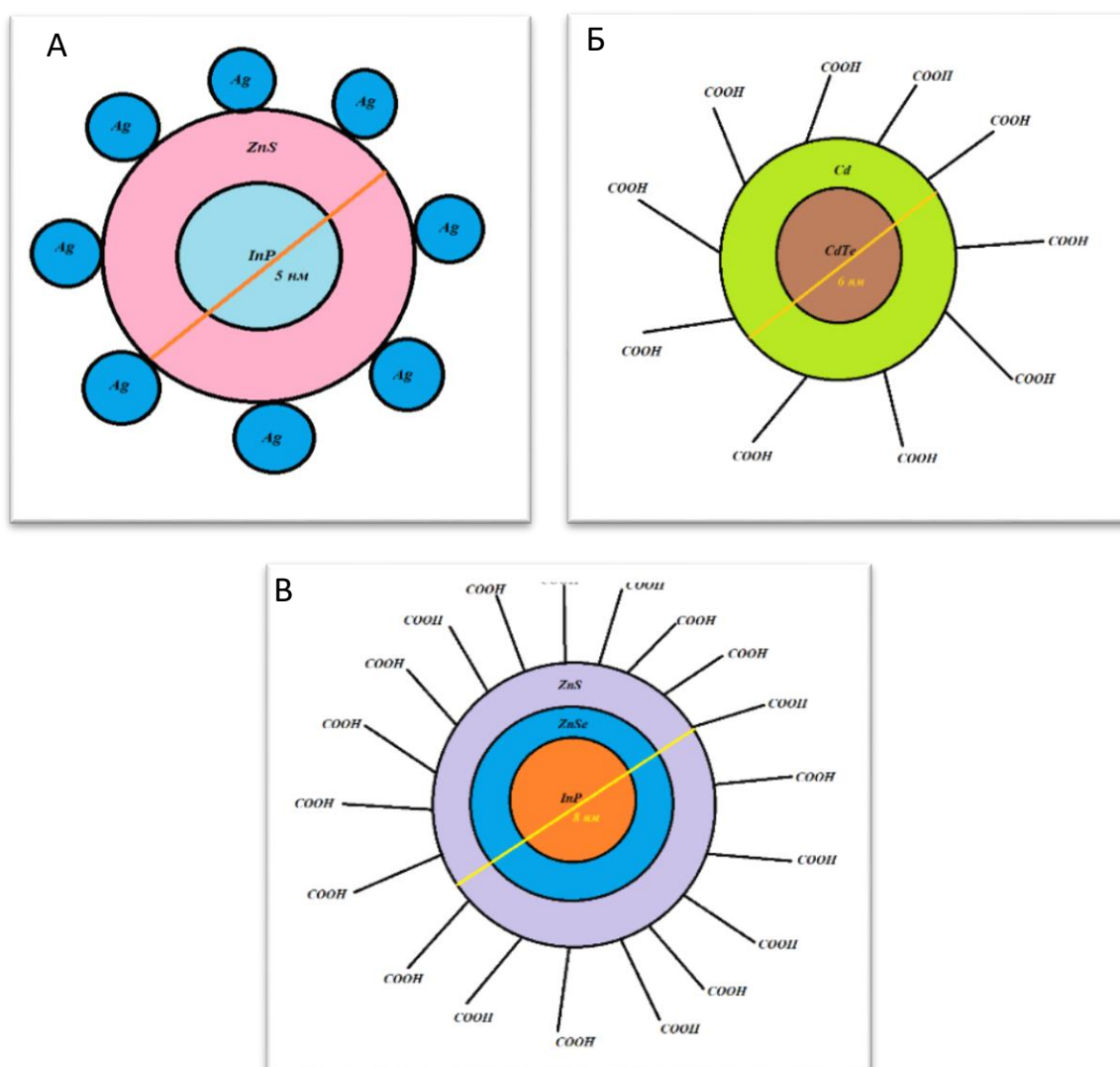
Ретроспективные исследования

На основании данных, полученных в ходе ретроспективного анализа клинико-функциональных результатов лечения бактериальных инфекций глаза в Екатеринбургском центре МНТК «Микрохирургия глаза», частота встречаемости антибиотикорезистентных штаммов (резистентность ко всем АБ) составляет 2,94% для бактериальных инфекций переднего отрезка глаза и 28,7% – для бактериального поражения заднего отрезка глаза. При этом частота потери глаза как органа составляет 12,2% для бактериального поражения роговицы и 8% – для бактериального поражения витреальной полости. Более того, функциональные исходы лечения при воспалительных заболеваниях заднего отрезка, вызванных штаммами с антибиотикорезистентностью, характеризуются регрессом зрительных функций на завершающем этапе лечения и отсутствием функциональной прибавки в исходе воспалительных заболеваний переднего отрезка глаза ($p \leq 0,05$). Полученные результаты доказывают недостаточную эффективность современных терапевтических методов лечения антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза по клинико-функциональным и анатомическим показателям.

Фундаментальные исследования

На первом этапе диссертационного исследования были синтезированы три типа КТ, отвечающих заданным параметрам по физическим, химическим и спектральным характеристикам, максимально приближенных к возможности применения в офтальмологической практике: InP/ZnSe/ZnS 650 МРА, представляющие собой 3-оболочечную структуру, диаметром $8,0 \pm 1,5$ нм; CdTe/Cd 710 МРА, представляющие собой 2-оболочечную структуру, диаметром $6,0 \pm 1,5$ нм; Ag(10%):InP/ZnS МРА, представляющие собой 2-

оболочечную структуру, диаметром $5,0 \pm 1,5$ нм, пассивированные 10% молекулами серебра, обладающие дополнительными антиинфекционными свойствами (Рисунок 4). Характеристики: для улучшения химической стабильности КТ и уменьшения периода полураспада поверхность всех КТ обработана 3-меркаптопропионовой кислотой, в качестве противоиона введен тетраметиламмоний; ширина пиков на полувысоте узкая (менее 150 нм), что также важно при одновременной идентификации множества флуоресцентных сигналов во время проведения спектрофотометрических исследований; спектры поглощения всех типов КТ варьируют в диапазоне от 350 до 750 нм (возбуждение и возможность генерации АФК при дневном свете); спектры флуоресценции всех типов КТ смещены в инфракрасную область спектра (минимизация токсического повреждения нейроретинальных структур).



А – КТ Ag(10%):InP/ZnS MPA

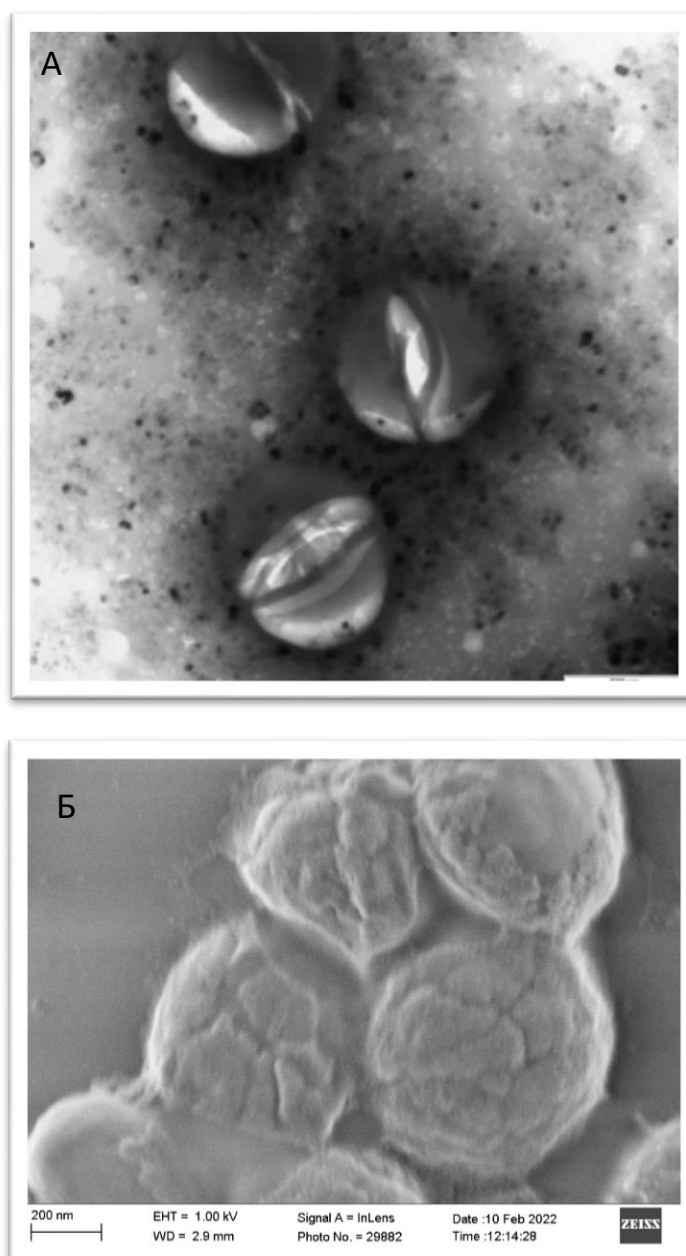
Б – CdTe/Cd 710 MPA

В – InP/ZnSe/ZnS 650 MPA

Рисунок 4 – Модели различных типов КТ

На втором этапе исследования были получены результаты возможности генерации АФК всеми исследуемыми типами КТ в широком диапазоне частот возбуждения, в реакциях окислителей (Ox) и восстановителей (Red). Генерация АФК активно проходит на сверхмалых масс. концентрациях, достигающих предела в 1000-кратных разведениях в видимой области спектра, при этом максимальная генерация АФК идет в диапазоне от 0,06 до 0,115% (100- и 1000-кратное разведение). Способность к выработке АФК регламентирована состоянием pH, что обусловлено изменением окислительно-восстановительного потенциала исследуемых объектов, однако изменение его в области крайних диапазонов не существенны ($p \leq 0,05$). В свою очередь, генерация АФК-окислителей растет в ряду: $\text{Ag}(10\%):\text{InP}/\text{ZnS} \ll \text{CdTe}/\text{Cd} < \text{InP}/\text{ZnSe}/\text{ZnS}$, что играет ключевую роль в отношении бактерицидных эффектов для патогенной микрофлоры. Генерация восстанавливающих форм АФК растет в ряду: $\text{CdTe}/\text{Cd} < \text{Ag}(10\%):\text{InP}/\text{ZnS} \ll \text{InP}/\text{ZnSe}/\text{ZnS}$, фундаментальные основы механизмов воздействия которых в отношении патогенной флоры пока не имеют клинической интерпретации. Скорости генерации окислителей в целом выше скорости генерации восстановителей (кроме $\text{Ag}(10\%):\text{InP}/\text{ZnS}$). АФК вырабатываются всеми типами КТ, вне зависимости от продолжительности их облучения в видимой области спектра (за период идентификации).

В результате **третьего этапа** исследования были получены данные по динамическому взаимодействию культуры МРЗС с КТ посредством ПЭМ/РЭМ. Было выявлено, что этапы адгезии КТ на поверхности бактериальной клетки начинаются через 5 минут после их взаимодействия и вероятно обусловлены электростатическими процессами; КТ свободно проникают через клеточную мембрану бактериальной клетки (в частности МРЗС); первые признаки разрушения бактериальной клетки с выходом ее содержимого начинают аналогично визуализироваться через 30 минут наблюдения, более того, вовлечение ядерного аппарата в процесс ее разрушения визуализируется практически на всех этапах наблюдения; последующая динамика разрушения сопровождается генерализованным выходом содержимого бактериальных клеток в межклеточное пространство, изменением их формы и объема в течение 60-120 минут, как и было показано в результате РЭМ/ПЭМ (Рисунок 5).



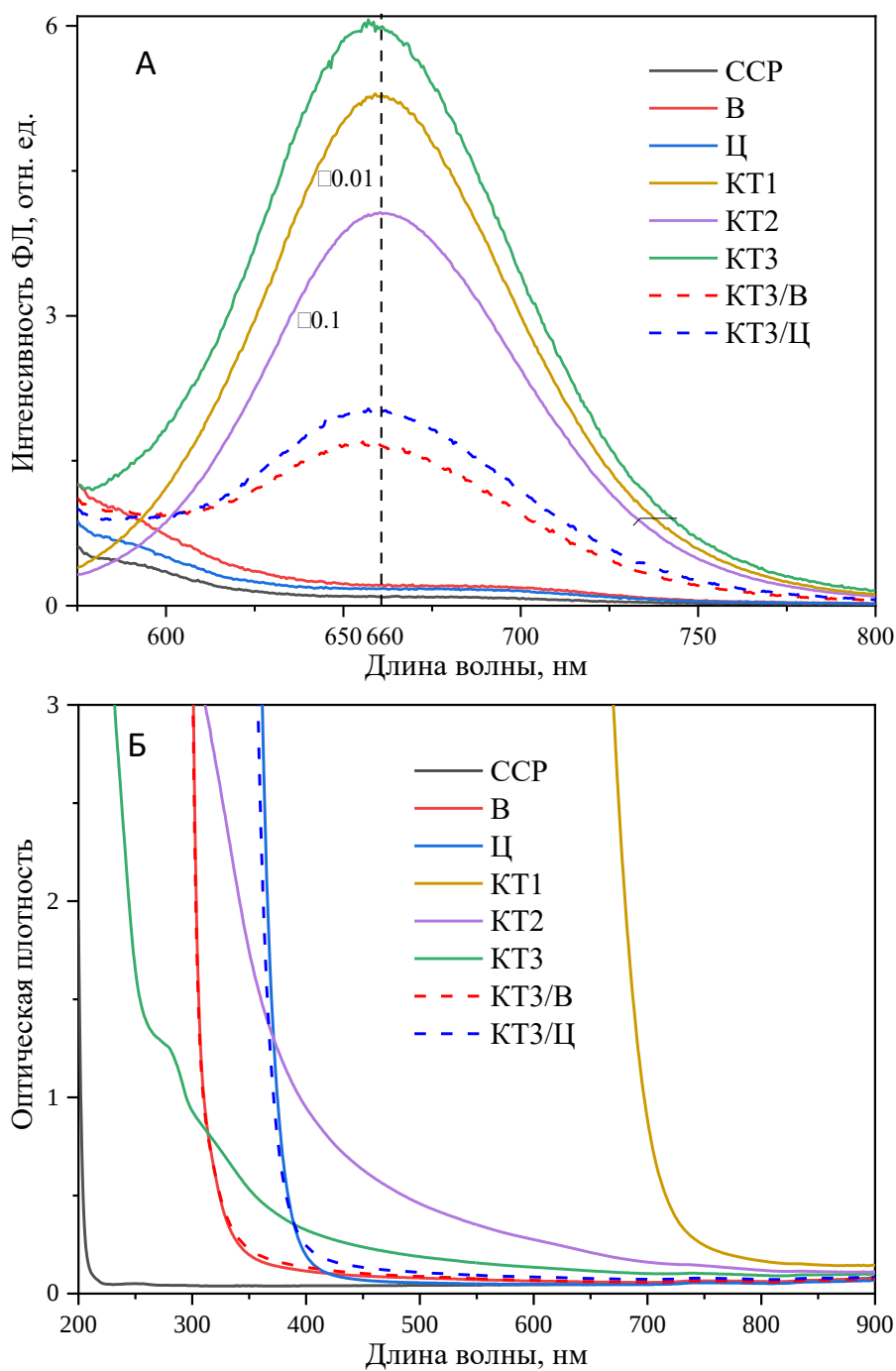
А – ПЭМ взаимодействия КТ с бактериальной клеткой через 1 минуту

Б – РЭМ процесса набухания бактериальной клетки с частичным выходом содержимого в межклеточное пространство через 60 минут

Рисунок 5 – РЭМ/ ПЭМ изображений бактерий МРЗС, взятых непосредственно с кровяного агара на углеродном скотче после смешивания с раствором КТ

Результаты **четвертого** этапа диссертационной работы продемонстрировали отсутствие физического (образование конгломератов, осадка) и химического влияния (деактивация соединений) исследуемых типов КТ (InP/ZnSe/ZnS и CdTe/Cd) и АБ, используемых для терапии инфекционных заболеваний переднего и заднего отрезков глаза на основании стабильности оптических и люминесцентных свойств (спектры флуоресценции и

оптической плотности) исследуемых растворов (КТ, АБ и их конъюгаты в различных концентрациях) (Рисунок 6).



А – спектр флуоресценции

Б – оптическая плотность (поглощение)

Рисунок 6 – Оптические характеристики исследуемых растворов и конъюгатов на их основе

Данные, полученные на **пятом этапе** диссертационной работы, доказали, что спектры возбуждения и эмиссии исследуемых КТ остаются пропорционально неизменными при варьировании температурного режима. Результаты, продемонстрированные на Рисунке 7, отображают зависимость

усредненного спектра свечения КТ от температуры. В диапазоне от 22° С до 50° С наблюдается смещение пика не более чем на 5 нм, что указывает на возможность стабильного состояния конъюгатов в условиях изменения температуры при контакте с биологическими средами человеческого организма.

В результате **шестого этапа** были получены данные, указывающие на негативное влияние биологического окружения на активность КТ. Спектр собственных колебаний белковых молекул лежит в диапазоне 240 нм, при образовании конъюгатов КТ с антителами, максимум спектра возбуждения сместился в ультрафиолетовую область: для длины волны возбуждения 225 нм максимум спектра эмиссии соответствует длине волны 345,5 нм, для длины волны возбуждения 230 нм максимум лежит в области 416 нм.

Седьмой этап исследования, посвященный возможности стерилизации КТ с помощью трековых мембран, продемонстрировал возможность прохождения КТ через них. Диаметр пор трековой мембраны, равный 50 нм, гарантированно задерживает потенциальных возбудителей бактериальной инфекции, в силу среднего размера бактериальной клетки равного 200-500 мкм. Отсутствие роста патогенной флоры в контрольной группе обусловлено, вероятно, собственными антиинфекционными свойствами КТ.

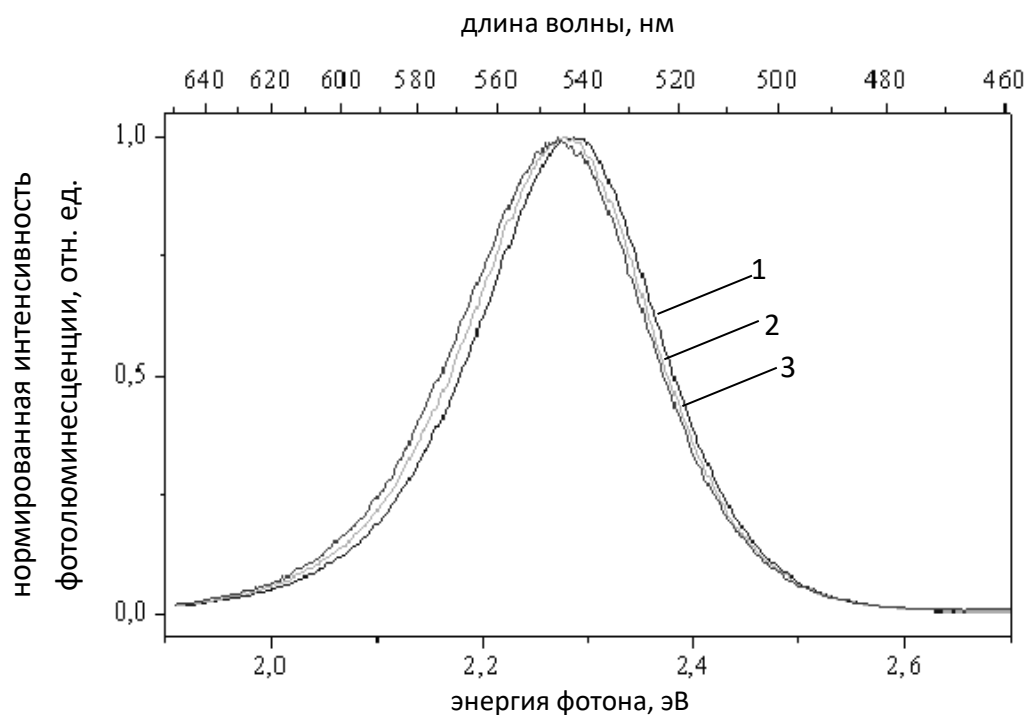


Рисунок 7 – Спектры эмиссии квантовых точек InP/ZnSe/ZnS 650 при возбуждении в полосе 300 нм: 1 – при температуре 22° С; 2 (серая линия) – при 37° С; 3 – при 50° С

Клинико-лабораторные исследования

В результате клинико-лабораторных исследований было выявлено, что КТ исследуемых типов, а именно Ag(10%):InP/ZnS, InP/ZnSe/ZnS и CdTe/Cd, в качестве конъюгатов с исследуемыми АБ (Ванкомицин, Левофлоксацин, Цефтазидим, Цефотаксим) продемонстрировали значимое увеличение антиинфекционной активности, выражающееся в увеличении ЗЗР диско-диффузионным методом в отношении актуальных глазных возбудителей инфекционных заболеваний переднего и заднего отрезков глаза (*St.aureus*, *St.epidermidis*, *E.faecalis*, *Esch.coli*, *Kl.pneumoniae*, *Ps.aeruginosa*). Вариабельность увеличения ЗЗР значимо более выражена у госпитальных штаммов микроорганизмов, в сравнении с амбулаторными штаммами. Концентрация КТ значимо не влияет на антиинфекционную активность конъюгатов в отношении амбулаторных и госпитальных штаммов микроорганизмов. Более того, источник возбуждения (свет видимой области спектра) значимо не влияет на повышение активности конъюгатов со всеми типами КТ. Наибольшую эффективность в отношении увеличения ЗЗР значимо продемонстрировали КТ типа Ag(10%):InP/ZnS в отношении амбулаторных и госпитальных штаммов микроорганизмов, что вероятнее всего обусловлено дополнительным ингибирующим воздействием серебра, входящим в структуру КТ. Прицельное исследование активности КТ в отношении мультирезистентной синегнойной инфекции продемонстрировало значимое увеличение ЗЗР, в среднем на $9,0 \pm 1,5$ мм (Таблица 2), что может являться ключевой точкой приложения КТ в отношении потенциального лечения резистентной глазной инфекции. 6% исследуемых амбулаторных штаммов микроорганизмов, вне зависимости от источника возбуждения и концентрации раствора КТ, находится в ЗЗР очень высокой эффективности (свыше 5 мм), 69% – высокой эффективности (2-5 мм), 9 % – в зоне умеренной эффективности (до 2 мм), у 16% выявлено отсутствие увеличения ЗЗР. 13% исследуемых госпитальных штаммов микроорганизмов, вне зависимости от источника возбуждения и концентрации раствора КТ, находится в ЗЗР очень высокой эффективности (свыше 5 мм), 77% – высокой эффективности (2-5 мм), 6% – в зоне умеренной эффективности (до 2 мм), у 4% выявлено отсутствие увеличения ЗЗР. Общую антиинфекционную активность КТ в различных концентрациях в сочетании с АБ в виде конъюгатов можно рассматривать как высокую.

Таблица 2 – Результаты образования ЗЗР в исследуемых образцах, где μ – среднее арифметической совокупности

Pseudomonas Aeruginosa						
С источником возбуждения						
ЗЗР без КТ (мм)	CdTe/Cd			InP/ZnSe/Zns		
	1:10	1:100	1:1000	1:10	1:100	1:1000
6 μ	23 μ	19 μ	11 μ	23 μ	19 μ	11 μ
Без источника возбуждения						
ЗЗР без КТ (мм)	1:10	1:100	1:1000	1:10	1:100	1:1000
6 μ	21 μ	18 μ	9 μ	20 μ	17 μ	8 μ

Доклинические исследования

Данные, полученные в ходе доклинических исследований, доказали значительное преимущество разработанной технологии лечения над стандартными терапевтическими подходами, применимыми в лечении инфекционных заболеваний переднего и заднего отрезков глаза. В случаях лечения инфекционного поражения роговицы, индуцированного мультирезистентной Гр⁺ и Гр⁻ микрофлорой, не было получено значительного регресса в отношении обратного развития симптомов по анализируемым признакам. Как правило, инфекционный процесс характеризовался затяжным течением, с вовлечением глубоких структур роговицы и требовал переключения на разработанную технологию лечения. Напротив, эпibuльбарные инстилляци конъюгатов во всех случаях демонстрировали выраженный регресс клинической симптоматики по всем анализируемым признакам.

Аналогичные клинические данные были получены в ходе моделирования инфекционного поражения заднего отрезка, индуцированного резистентной Гр⁺ и Гр⁻ микрофлорой. Стандартные АБ, применяемые в виде интравитреальных инъекций, не могли нивелировать распространение патологического процесса. Лабораторные животные, получавшие лечение в виде ИВИ конъюгатов демонстрировали полный регресс клинической симптоматики. Аналитические данные, полученные на основании математической обработки динамики обратного развития симптомов (К) и показателя эффективности метода лечения (к) демонстрируют улучшение

анализируемых признаков в среднем в 2,6 раза, что доказывает высокую эффективность предложенной технологии лечения ($p \leq 0,05$) (Таблица 3).

Таблица 3 – Сводные данные эффективности проводимого лечения на основании показателя динамики обратного развития симптомов (K) и показателя эффективности метода лечения (k)

Передний отрезок				
Группа АБ	K (абс.)		k (%)	
	Тобрамицин	Конъюгат	Тобрамицин	Конъюгат
Флора – Гр-	2,2	4,3	37%	87%
Группа АБ	Левофлоксацин		Левофлоксацин	
	Конъюгат	Конъюгат	Конъюгат	Конъюгат
Флора – Гр+	2,1	4,5	34%	88%
Задний отрезок				
Группа АБ	K (абс.)		k (%)	
	Цефтазидим	Конъюгат	Цефтазидим	Конъюгат
Флора – Гр-	2,7	4,2	33%	82%
Группа АБ	Ванкомицин		Ванкомицин	
	Конъюгат	Конъюгат	Конъюгат	Конъюгат
Флора – Гр+	2	4,6	31%	91%

Анатомическая и функциональная безопасность

На основании изучения анатомической и функциональной безопасности было выявлено, что 10% раствор КТ CdTe/Cd МРА 710 в нативном состоянии привел к выявлению признаков токсичности со стороны зрительного анализатора у всех подопытных животных, которые проявлялись в виде отека роговицы, выраженного полнокровия сосудов радужной оболочки, выраженной гиперрефлективной взеси в витреальной полости с отсутствием признаков эвакуации раствора. Данные подтверждались наличием выраженной преретинальной взеси по данным ОКТ заднего отрезка глаза. По данным ЭФИ (суммарные показатели амплитуды и латентности), структурный ответ на световой стимул отсутствовал на всех этапах регистрации. В свою очередь 100-кратное разведение раствора КТ CdTe/Cd МРА 710 (0,1% раствор) не привело к существенным клиническим отклонениям от нормы при динамическом наблюдении, однако по показателям ЭФИ было выявлено значительное снижение амплитуды а- и b-волн, с увеличением латентности а-волны палочкового ответа. Также, снижение амплитуды обоих компонентов зарегистрировано во время максимального и колбочкового отклика. На основании этого можно сделать заключение, что вышеописанные концентрации КТ CdTe/Cd МРА 710 – 10 и 0,1% приводят к клинической и функциональной токсичности зрительного анализатора при интравитреальном введении. Однако КТ CdTe/Cd МРА 710 в 1000-кратном разведении (0,01%), а

также конъюгаты с Ванкомицином и Цефтазидимом продемонстрировали полное отсутствие клинических и функциональных нарушений со стороны зрительного анализатора.

Результаты исследования КТ типа InP/ZnSe/ZnS 650 10% масс. и КТ Ag(10%):InP/ZnS МРА 10% масс., имеющих иную химическую структуру и рассматриваемые в диссертационном исследовании, как КТ с дополнительной функционализацией серебром, не привели к развитию функциональных и анатомических нарушений во всех исследуемых концентрациях, за исключением группы КТ типа InP/ZnSe/ZnS 650 10% масс. Признаки токсического повреждения структур переднего отрезка проявлялись в виде полнокровия сосудов радужной оболочки. Однако изменение каких-либо анализируемых показателей со стороны клинических проявлений и функционального состояния выявлено не было. На основании этого, можно сделать заключение, что КТ данной химической структуры в нативном виде или в виде конъюгатов не вызывают структурных и функциональных нарушений при интравитреальном введении у исследуемых животных. Тем не менее, нативную концентрацию InP/ZnSe/ZnS 650 10% масс. необходимо исключить из потенциального клинического использования, в целях минимизации рисков токсического повреждения интраокулярных структур.

Клеточная и тканевая безопасность

На основании данных, полученных в ходе исследования тканевой безопасности в условиях моделирования воспалительного процесса, который является дополнительным стимулирующим фактором гистоморфологического повреждения структур зрительного анализатора, было выявлено отсутствие патологических изменений со стороны структур глаза, вызванных интравитреальным введением КТ типа Ag(10%):InP/ZnS МРА 0,1 мл в стандартной 10%, 0,1 и 0,01% концентрациях (Рисунок 8).

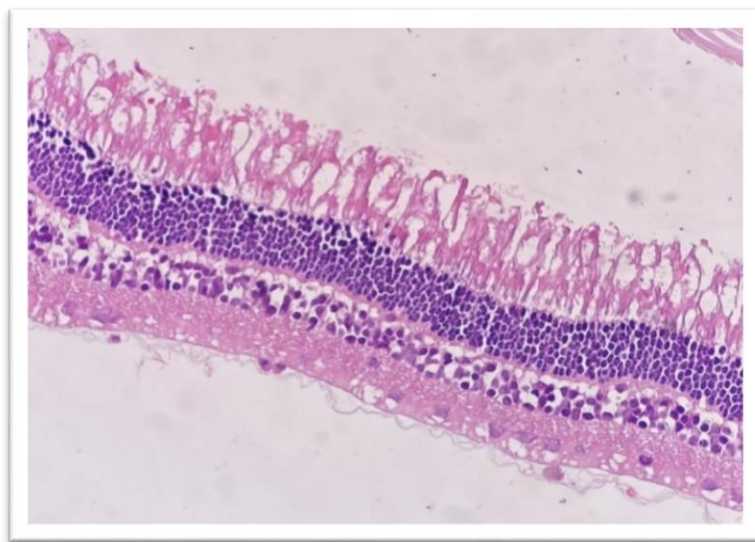


Рисунок 8 – Пример: сетчатка лабораторного животного, получившего ИВИ КТ Ag(10%):InP/ZnS МРА 0,1 мл в стандартной 10% концентрации. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение x400

Аналогичным образом, практически полное отсутствие гистоморфологических изменений и явления слабовыраженной воспалительной реакции были обнаружены в ходе исследования воздействия раствора Ag(10%):InP/ZnS МРА 0,05 мл в стандартной 10%, 0,1 и 0,01% концентрациях, в сочетании с 2,25 мг/0,05 мл Цефтазидима на зрительный анализатор. Наибольшие признаки воспалительных изменений структур глаза выявлены у группы животных, получавших интравитреальную инъекцию 2,25 мг/0,1 мл Цефтазидима, в качестве контроля. Данное явление, вероятно, можно объяснить наименьшей антиинфекционной активностью нативного Цефтазидима в монотерапии в отношении синегнойной инфекции.

При изучении токсического действия тестируемых препаратов на монослое ЛЭЧ-4(81) (клеточная безопасность) было установлено, что при инкубации культуры с КТ в течение 48 часов они обладают минимальным цитопатическим действием в концентрации (1-0,01%), при разведении (0,001%) оно у всех КТ отсутствует. Однако квантовые точки Ag (10%) InP/ZnS МРА 710 (КТ2) обладают наименьшим токсическим действием на монослой культуры клеток и проявляют его лишь в концентрации 1-0,1%. МТТ-тест показал, что при дозировке 0,001мкг/мл исследуемых КТ (CdTe/Cd МРА 710, Ag (10%) InP/ZnS МРА 710, InP/ZnSe/ZnS 650 МРА) диапазон индекса цитотоксичности на клеточную культуру ЛЭЧ-4(81) составил от $0,011 \pm 0,005$ до $0,052 \pm 0,022\%$, что подтверждает отсутствие выраженной токсичности *in vitro* исследуемых КТ в концентрации от 0,01%.

Клинико-фармакологические исследования

В результате разработки и оценки возможности применения методов фармакотерапии антибиотикорезистентных инфекций глазного яблока на основании разработанной технологии лечения были сформулированы клинические блок-схемы для фармакотерапии антибиотикорезистентной внутриглазной инфекции, базирующиеся на клинических проявлениях, результатах бактериологического посева, а также анализа уровня клинического ответа на базовую терапию (Рисунок 9):

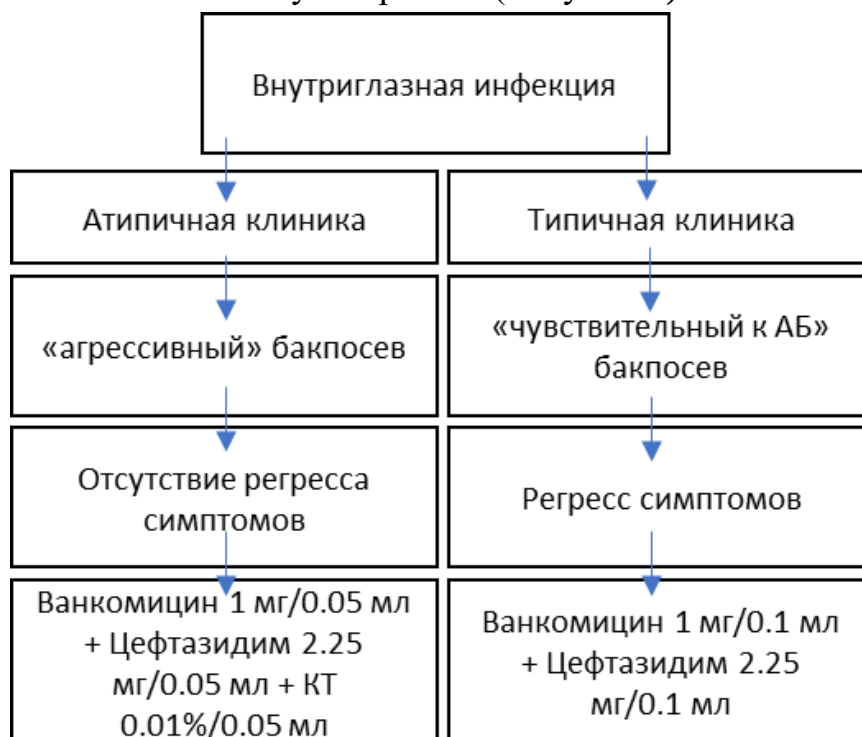


Рисунок 9 – Методы фармакотерапии антибиотикорезистентных внутриглазных инфекций на основании разработанной технологии лечения

Предлагаемая фармакотерапия антибиотикорезистентных внутриглазных инфекций на основании разработанной технологии лечения заключается в комбинированном применении вышеописанных АБ (Ванкомицин, Цефтазидим) и раствора КТ. При этом раствор КТ готовится ex tempore и добавляется к раствору любого из подготовленных АБ. В качестве КТ используются любой из трех видов, изучаемых в диссертационном исследовании, в концентрации 0,01% и объеме 0,05 мл: КТ CdTe/Cd 710 МРА, КТ InP/ZnSe/ZnS 650 МРА, КТ Ag(10%):InP/ZnS МРА. Таким образом, схема разведения для ИВИ приобретает вид: Ванкомицин 1 мг/0,1 мл (уменьшить объем до 0.05 мл при добавлении раствора КТ) + Цефтазидим 2,25 мг/0,1 мл (уменьшить объем до 0,05 мл при добавлении раствора КТ) + КТ (1-3 тип) 0.05 мл.

Аналогичным образом были сформированы блок-схемы для лечения инфекции переднего отрезка. Дифференцированный подход при переключении пациента с базовой АБ-терапии на разработанную технологию лечения опирается на отсутствие клинического ответа на базовую терапию на протяжении 48-72 часов (Рисунок 10).

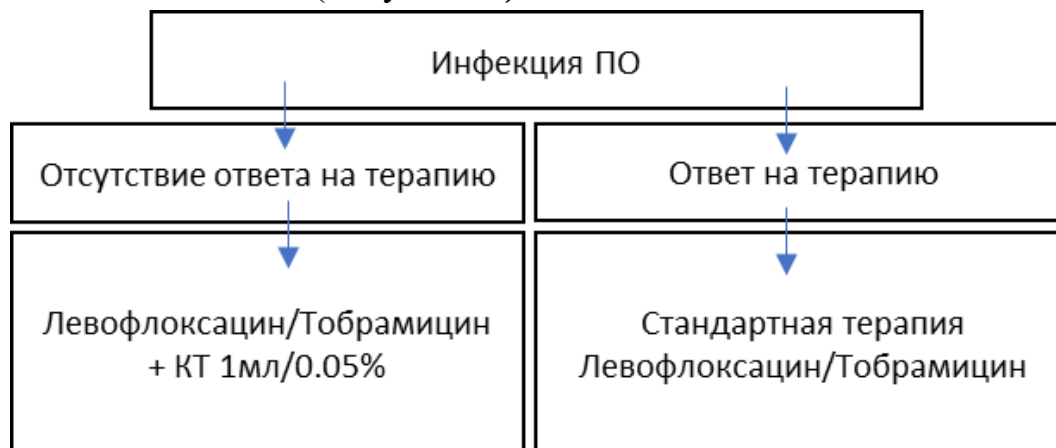


Рисунок 10 – Методы фармакотерапии антибиотикорезистентных инфекций переднего отрезка на основании разработанной технологии лечения

Разработанная схема фармакотерапии антибиотикорезистентных инфекций переднего отрезка на основании предложенной технологии лечения заключается в комбинированном применении вышеописанных АБ (Левифлоксацин, Тобрамицин) и раствора КТ. Процесс приготовления комплекса заключается в добавлении к 5 мл нативного раствора АБ 0,05% раствора КТ в объеме 1 мл (для получения концентрации 0,01%). В качестве КТ аналогично используются любой из трех видов, изучаемых в диссертационном исследовании.

Фармакоэкономический анализ разработанной и «стандартной» технологий лечения внутриглазной инфекции посредством расчета ICER составил -845 898,80 Р в рамках территориальной программы государственных гарантий и -103 483,12 Р в затратах медицинской организации и продемонстрировал значительное снижение затрат и рост эффективности в пользу разработанной технологии лечения. Экономия средств при этом составила 67 671 904,00 Р в рамках ТПГГ и 132 762 707,48 Р – в рамках затрат МО.

В свою очередь, данные, полученные в ходе фармакоэкономического анализа разработанной и «стандартной» технологий лечения бактериального кератита, продемонстрировали изменение ICER в -263 239,74 Р в рамках ТПГГ и -249 786,75 Р – в рамках затрат МО. При этом оба показателя демонстрируют снижение затрат и рост эффективности в пользу разработанной технологии

лечения. Экономия средств при этом составляет 67 184 217,84 Р в рамках ТППГ и 63 750 737,45 Р – в рамках затрат МО соответственно.

Сформулированные требования для разработки лекарственного препарата с использованием КТ и конъюгатов на их основе для применения в офтальмологической практике в качестве новой технологии лечения включают в себя совокупность данных, полученных в ходе диссертационного исследования.

Ориентированность на офтальмопатологию реализуется посредством данных по оптимальным физико-химическим и биологическим характеристикам КТ, ориентированным на применение в офтальмологической практике, а именно: синтезируемые КТ содержат в своем составе металлы, обладающие потенциальными антиинфекционными свойствами (1% серебро); предельный диаметр КТ не превышает 10 нм, что соответствует размерному ряду в 2-3 оболочки, для обеспечения прохождения через клеточную мембрану возбудителя инфекции, в совокупности с сохранением реактогенных свойств (увеличение количества оболочек, неминуемо приводит к увеличению размера КТ, увеличивая стабильность, с пропорциональным снижением реакционных свойств); в составе КТ присутствуют только защищенные полупроводники, не обладающие токсическими свойствами во время полураспада молекулы; в качестве растворителя массы вещества КТ используется вода, для возможности эпibuльбарного и интравитреального использования; квантовый выход флуоресценции не превышает 0,5 (50%), являясь индикатором образования АФК (квантовый выход равный 1 стремится к образованию фотона, в ответ на каждый поглощенный, что нивелирует участие свободных электронов на внешнем энергетическом уровне КТ в окислительно-восстановительных реакциях); спектр поглощения КТ – широкий, для обеспечения возбуждения в широком диапазоне частот, в том числе в видимой области спектра; спектр эмиссии КТ – в узком диапазоне, для минимизации риска токсического повреждения интраокулярных структур; функционализация КТ выполнена химически активными карбоксильными или аминными группами, для увеличения их реакционной способности; для улучшения химической стабильности КТ и уменьшения периода полураспада поверхность обработана 3-меркаптопропионовой кислотой, в качестве противоиона введен тетраметиламмоний.

Требование к эффективности КТ в составе разработанной технологии лечения обеспечивается рядом доказанных фактов, таких как: все типы исследуемых КТ способны к выработке АФК, что показано на основании Ох и Red реакций с использованием CytC и дегидрородамина; генерация АФК активно проходит на сверхмалых масс. концентрациях, достигающих предела

в 1000-кратных разведениях в видимой области спектра, при этом максимальная генерация АФК идет в диапазоне от 0,06 до 0,115%; АФК вырабатываются всеми типами КТ, вне зависимости от продолжительности их облучения в видимой области спектра. Также в пользу эффективности свидетельствуют данные, полученные в ходе экспериментального взаимодействия КТ с бактериальной клеткой по данным РЭМ/ПЭМ, в ходе которого доказано, что КТ обладают потенциалом к проникновению непосредственно во внутриклеточное пространство через сформированные мембранные каналы. Механизмы, происходящие в клетке микроба после проникновения КТ, сопровождаются ее полным разрушением, предположительно физико-химической основой которых являются процессы образования АФК посредством химической активности КТ. Доклиническая эффективность разработанной технологии лечения подкреплена положительными результатами, полученными в ходе исследования влияния квантовых точек и конъюгатов на их основе на возбудителей инфекционных офтальмологических заболеваний *in vitro*, а также в ходе экспериментального моделирования инфекционного поражения роговицы и витреальной полости с помощью КТ и конъюгатов на их основе, вызванного антибиотикорезистентной G^- и G^+ микрофлорой на лабораторных животных.

Требование по безопасности реализовано за счет положительных результатов, полученных в ходе исследования анатомической, функциональной, тканевой и клеточной безопасности применения КТ и конъюгатов на их основе в новой технологии лечения антибиотикорезистентных инфекций глазного яблока.

Требование по простоте изготовления конъюгатов на основе КТ реализовано посредством смешивания вышеописанных растворов КТ с АБ, используемыми в офтальмологической практике. Зависимость формы доставки регламентирует особенности подготовки доз для реализации лечебного процесса по формулам:

- передний отрезок:

КТ (x) 0,05%/1 мл + АБ (y) 5 мл = КТ/АБ (z) 0,01%/6 мл ($x+y=z$);

- задний отрезок:

КТ (x) 0,01%/0,05 мл + АБ (y) (1 мг/2,25 мг)/0,05 мл = КТ/АБ (z) 0,01%/0,1 мл.

Простота использования разработанной технологии лечения регламентируется стандартными режимами дозирования для АБ, применяемых в офтальмологической практике для разных структур зрительного анализатора.

Требование по экономической обоснованности реализовано посредством проведения фармакоэкономических расчетов по

перспективности применения разработанной технологии лечения, которые продемонстрировали положительный экономический компонент.

Выводы

1. Частота встречаемости микрофлоры с множественной лекарственной устойчивостью варьирует от 2,94 до 28,2% в этиологической структуре бактериальных инфекций глаза, современные методы терапии бактериальных инфекций глаза с множественной лекарственной устойчивостью не обладают эффективностью по клинико-функциональным и анатомическим показателям ($p \leq 0,05$).

2. Применение полупроводниковых квантовых точек и конъюгатов на их основе в офтальмологической практике в лечении антибиотикорезистентных инфекций возможно, и обусловлено техническими особенностями синтеза квантовых точек с заданными и моделируемыми физико-химическими, оптико-люминесцентными свойствами, доказанной способностью к управляемой генерации активных форм кислорода, изученным механизмом активного деструктивного воздействия квантовых точек на бактериальную клетку, способностью к образованию конъюгатов с антибиотиками без взаимного физического и химического ингибирования, изученными особенностями влияния биологических и температурных факторов на свойства квантовых точек, а также разработанных методов их стерилизации.

3. Исследуемые квантовые точки и конъюгаты на их основе обладают антибактериальной активностью *in vitro* в отношении актуальных возбудителей бактериальных глазных инфекций (*St. aureus*, *St. epidermidis*, *E. faecalis*, *Ps. aeruginosa*), в том числе антибиотикорезистентных (амбулаторные и внутрибольничные штаммы), в широком диапазоне концентраций (от 10 до 0,01%) ($p \leq 0,05$).

4. Исследуемые квантовые точки и конъюгаты на их основе обладают доклинической (моделирование инфекционного процесса на лабораторных животных) антибактериальной активностью в отношении Гр- и Гр+ возбудителей антибиотикорезистентной бактериальной инфекции глаза (бактериальное поражение роговицы и витреальной полости) в различном диапазоне концентраций (от 10 до 0,01%), увеличивая эффективность лечения и скорость обратного развития симптомов в сравнении со стандартной антибактериальной терапией в 2,6 раза ($p \leq 0,05$).

5. На основании клинических данных, функциональных и инструментальных методов обследования установлено, что исследуемые

квантовые точки и конъюгаты на их основе обладают анатомической и функциональной безопасностью в концентрации 0,01% и менее ($p \leq 0,05$).

6. На основании цитологических и гистоморфологических методов исследования доказано, что квантовые точки и конъюгаты на их основе обладают клеточной и тканевой безопасностью в концентрации 0,01% и менее ($p \leq 0,05$).

7. Сформулированные требования для разработки лекарственного препарата с использованием квантовых точек и конъюгатов на их основе для применения в офтальмологической практике отвечают следующим критериям: ориентированность на офтальмопатологию, эффективность, безопасность, простота изготовления, простота использования, экономическая обоснованность.

8. Методы фармакотерапии антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза в разработанной технологии лечения заключаются во введении в состав используемого антибиотика раствора квантовых точек в концентрации 0,01% в качестве терапии первой линии или терапии резерва на основании клинических проявлений, динамики обратного развития симптомов, результатов бактериологического посева, уровня ответа на стартовую антиинфекционную терапию.

9. Сравнение разработанной и «стандартной» технологий лечения внутриглазной инфекции посредством расчета инкрементного показателя «затраты-эффективность» или «затраты-полезность» в рамках территориальной программы государственных гарантий и затрат медицинской организации демонстрирует снижение затрат и рост эффективности в пользу разработанной технологии лечения, при более чем 200% экономии средств.

Практические рекомендации

1. Использование конъюгатов на основе квантовых точек в клинической практике возможно только после проведения клинических исследований и получения всех разрешительных документов в соответствии с действующим законодательством Российской Федерации.

2. Совокупность проведенных в ходе диссертационной работы исследований теоретического, фундаментального, экспериментального, экономического и прикладного характера позволила создать новое лекарственное средство и сформировало структурированную базу для выполнения последующих этапов, необходимых для регистрации лекарственного препарата, обладающего активностью в отношении антибиотикорезистентных инфекционных заболеваний глаза бактериальной этиологии.

3. Данные, полученные в ходе диссертации, в перспективе могут быть использованы клиницистами, клиническими фармакологами и сотрудниками структурных подразделений, отвечающих за выпуск, регистрацию и оборот лекарственных препаратов на территории РФ.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации в рецензируемых изданиях ВАК РФ, Web of Science или Scopus

1. Грибковый эндофтальмит. Обзор литературы / Казайкин В.Н., **Пономарев В.О.** // Офтальмология. – 2020. – № 17(3S). – С. 556-565.
2. Программное обеспечение для автоматического расчёта индивидуальной дозы антибиотиков при интравитреальном введении при лечении бактериального эндофтальмита на базе математического моделирования витреальной полости глазного яблока / Казайкин В.Н., **Пономарёв В.О.**, Пономарёв О.П., Дудоров А.Г., Ибрафилов К.Т. // Офтальмология. – 2020. – № 1. – С.63 – 70
3. Современная роль и перспективы электрофизиологических методов исследования в офтальмологии. Обзор литературы / Казайкин В.Н., **Пономарев В.О.**, Лизунов А.В., Жданов А.Е., Долганов А.Ю., Борисов В.И. // Офтальмология. – 2020. – № 17(4). – С. 69-675.
4. Современные проблемы антибиотикотерапии в офтальмологии и перспективные пути их решения. Обзор литературы / **Пономарев В.О.**, Казайкин В.Н., Пономарев О.П. // Офтальмология. – 2020. – № 17(4). – С. 683-691.
5. Оценка офтальмотоксического воздействия квантовых точек и биоконъюгатов на их основе в аспекте перспектив лечения резистентных эндофтальмитов. Экспериментальное исследование. (1-й этап) / **Пономарев В.О.**, Казайкин В.Н., Лизунов А.В., Вохминцев А.С., Вайнштейн И.А., Дежуров С.В. // Офтальмология. – 2021. – № 18(3). – С. 476-487.
6. Оценка офтальмотоксического воздействия квантовых точек InP/ZnSe/ZnS 660 и биоконъюгатов на их основе в аспекте перспектив лечения резистентных эндофтальмитов. Экспериментальное исследование. Часть 2 (1-й этап) / **Пономарев В.О.**, Казайкин В.Н., Лизунов А.В., Вохминцев А.С., Вайнштейн И.А., Дежуров С.В., Марышева В.В. // Офтальмология. – 2021. – № 18(4). – С. 876-884.
7. Лабораторный анализ антиинфекционной активности квантовых точек и биоконъюгатов на их основе в аспекте перспектив лечения воспалительных заболеваний глаза. Экспериментальное исследование (часть 3) / **Пономарев В.О.**, Казайкин В. Н., Лизунов А.В., Вохминцев А.С.,

Вайнштейн И.А., Розанова С.М., Кырф М.В. // Офтальмология. – 2022. – № 19(1). – С. 188–194.

8. Лабораторный анализ антиинфекционной активности квантовых точек и биоконъюгатов на их основе в отношении потенциальной глазной синегнойной инфекции. Экспериментальное исследование (часть 4) / **Пономарев В.О.**, Казайкин В. Н., Лизунов А.В., Розанова С.М., Кырф М.В., Ткаченко К.А. // Офтальмология. – 2022. – № 19(2). – С. 429–433.

9. Применение метода MALDI-TOF масс-спектрометрии в определении возбудителя эндофтальмита. Клинический случай / Лизунов А.В., **Пономарев В.О.**, Казайкин В.Н., Розанова С.М., Кырф М.В., Хасанова Д.Г. // Офтальмология. – 2022. – № 19(3). – С. 681-686.

10. Перспективы применения наночастиц Ag(10%):InP/ZnS МРА в лечении дрожжевых кератомикозов / **Пономарев В.О.**, Казайкин В.Н., Дежуров С.В., Розанова С.М., Кырф М.В., Тимофеев В.Л. // Офтальмохирургия. – 2022. – № 4. – С. 66-73.

11. Оценка антиинфекционной активности биоконъюгатов на основе квантовых точек CdTe/Cd МРА 710 и Левофлоксацина в отношении стафилококковой инфекции роговицы. Экспериментальное исследование / **Пономарев В.О.**, Казайкин В.Н., Ткаченко К.А., Вохминцев А.С., Вайнштейн И.А., Розанова С.М., Кырф М.В., Марышева С.В. // Офтальмология. – 2022. – № 19(4). – С. 808-814.

12. Бактериальный кератит. Часть 1. Эпидемиология, этиология, патофизиология, факторы риска, клиника, актуальные аспекты диагностики / Шиловских О.В., **Пономарев В.О.**, Казайкин В.Н., Ткаченко К.А., Демченко Н.С. // Офтальмология. – 2023. – № 20(1). – С. 17-23.

13. Бактериальный кератит. Часть 2. Актуальные аспекты лечения // Шиловских О.В., **Пономарев В.О.**, Казайкин В.Н., Ткаченко К.А. // Офтальмология. – 2023. – № 20(1). – С. 24-32.

14. Применение квантовых точек InP/ZnSe/ZnS в лечении экспериментального антибиотикорезистентного эндофтальмита *in vivo* / **Пономарев В.О.**, Казайкин В.Н., Ткаченко К.А., Вохминцев А.С., Вайнштейн И.А., Жданов А.Е. // Офтальмология. – 2023. – № 20(1). – С. 120-127.

15. Оценка антиинфекционной активности комплекса на основе квантовых точек InP/ZnSe/ZnS 660 и тобрамицина в отношении синегнойной инфекции роговицы. Экспериментальное исследование / Шиловских О.В., **Пономарев В.О.**, Казайкин В.Н., Ткаченко К.А., Вохминцев А.С., Вайнштейн И.А., Розанова С.М., Кырф М.Ф., Марышева С.В. // Офтальмология. – 2023. – № 20(1). – С. 157-164.

16. Современные технологии микробиологических исследований в офтальмологии. Часть 1 / Шиловских О.В., **Пономарев В.О.**, Казайкин В.Н., Куликов А.Н., Демченко Н.С., Ткаченко К.А., Бейкин Я.Б., Розанова С.М., Кырф М.В. // Офтальмохирургия. – 2023. – № 1. – С. 97–102.

17. Современные технологии микробиологических исследований в офтальмологии. Обзор литературы. Часть 2 / Шиловских О.В., **Пономарев В.О.**, Казайкин В.Н., Куликов А.Н., Демченко Н.С., Ткаченко К.А., Бейкин Я.Б., Розанова С.М., Кырф М.В. // Офтальмохирургия. – 2023. – № 2. – С. 86–90.

18. Грибковый кератит. Часть 1. Этиоморфология, исторические аспекты, эпидемиология, факторы риска, патогенез и клинические особенности / Шиловских О.В., **Пономарев В.О.**, Тимофеев В.Л. // Офтальмология. – 2023. – № 20(3). – С. 423-430.

19. Грибковый кератит. Часть 2. Диагностика и лечение / Шиловских О.В., **Пономарев В.О.**, Тимофеев В.Л. // Офтальмохирургия. – 2023. – №3. – С. 86-96.

20. Экспериментальное лечение эндофтальмита, вызванного синегнойной инфекцией с множественной лекарственной устойчивостью, с помощью конъюгатов на основе наночастиц / **Пономарев В.О.**, Казайкин В.Н., Ткаченко К.А., Тимофеев В.Л., Дудоров А.Г. // Офтальмохирургия. – 2023. – № 3. – С. 86–96.

21. Исследование фармакодинамики технологии лечения резистентных бактериальных инфекций с использованием квантовых точек / **Пономарев В.О.**, Омеляновский В.В. // Фарматека. – 2023. – № 9/10. – С. 122-127.

22. Перспективы использования наночастиц (квантовых точек) в офтальмологии / **Пономарев В.О.**, Ткаченко К.А. // Офтальмохирургия. – 2024. – № 142(1). – С. 86-93.

Статьи и тезисы в других изданиях:

1. Современное применение электрофизиологических методов в диагностике заболеваний глаза и оценке токсических эффектов фармакологических препаратов (краткий обзор литературы) / **Пономарев В.О.**, Казайкин В.Н., Лизунов А.В., Титаренко Е.М. // Отражение. – 2021. - №2. – С. 36- 40.

Патенты РФ

1. Патент № 2803055 Российская Федерация. Лечение резистентного острого эндофтальмита с помощью квантовых точек / Пономарев В.О., Казайкин В.Н. / заявитель и патентообладатель. – Акционерное общество «Екатеринбургский центр МНТК «Микрохирургия глаза» (RU) – Заявка № 2021129977; приоритет – 12.10.2021; дата государственной регистрации – 05.09.2023.

2. Патент № 2790703 Российская Федерация. Лекарственное средство для лечения резистентного грибкового кератита и способ его применения / Пономарев В.О., Казайкин В.Н., Тимофеев В.Л., Ткаченко К.А. / заявитель и патентообладатель. – Акционерное общество «Екатеринбургский центр МНТК «Микрохирургия глаза» (RU) – Заявка № 2022123446; приоритет – 02.09.2022; дата государственной регистрации – 28.02.2023.

3. СВИДЕТЕЛЬСТВО о государственной регистрации базы данных № 2023623812 Российская Федерация. Анализ заболеваемости острым бактериальным эндофтальмитом в период с 2022 по 2023 год / Пономарев В.О., Казайкин В.Н., Коваленко Е.Г. / заявитель и патентообладатель. – Акционерное общество «Екатеринбургский центр МНТК «Микрохирургия глаза» (RU) – Заявка № 2023623103; приоритет – 26.09.2023; дата государственной регистрации – 08.11.2023.

4. Патент № 2811935 Российская федерация. Лечение резистентного бактериального кератита с помощью квантовых точек / Пономарев В.О., Казайкин В.Н., Ткаченко К.А. / заявитель и патентообладатель. – Акционерное общество «Екатеринбургский центр МНТК «Микрохирургия глаза» (RU) – Заявка № 2022130131/14(065907); приоритет – 22.02.2023; дата государственной регистрации – 18.01.2024.

Список сокращений

АБ – антибиотик
АФК – активная форма кислорода
Гр⁻ – грамотрицательная микрофлора
Гр⁺ – грамположительная микрофлора
ЗЗР – зона задержки роста
ИВИ – интравитреальная инъекция
КТ – квантовая точка
ЛЭЧ – легкие эмбриона человека
МЛУ – множественная лекарственная устойчивость
МО – медицинская организация
МРЗС - метициллин-резистентный золотистый стафилококк
ОКТ – оптическая когерентная томография
ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия
СЭМ/РЭМ – сканирующая/растровая электронная микроскопия
ТПГГ – территориальная программа государственных гарантий
УЗИ – ультразвуковое исследование (сонография)
ЭРГ – электроретинограмма
ЭФИ – электрофизиологическое исследование
CytC – цитохром C
FRET – Ферстеровский перенос энергии (англ. Förster resonance energy transfer)
IC – индекс цитотоксичности (англ. index of cytotoxicity)
ICER – инкрементальный показатель «затраты-эффективность» (англ. incremental cost-effectiveness ratio)
McF – МакФарланд, стандарт
Ох – окислитель
pH – водородный показатель
Red – восстановитель

Биографические данные

Пономарев Вячеслав Олегович родился 2 октября 1988 года в семье служащих в городе Смоленске. В 2005 году после окончания школы поступил в Смоленскую государственную медицинскую академию, которую окончил в 2011 году по специальности «Лечебное дело». С 2011 по 2012 годы проходил обучение в ординатуре по специальности «Офтальмология» в ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, г. Москва.

С 2012 года по настоящее время совмещает работу врача офтальмолога-хирурга в отделении витреоретинальной хирургии АО «Екатеринбургский центр «МНТК Микрохирургия глаза» с административной должностью.

С 2017 по 2021 годы по совместительству возглавлял диагностическое отделение в АО «Екатеринбургский центр «МНТК Микрохирургия глаза».

В 2020 году успешно защитил кандидатскую диссертацию под руководством д.м.н. Казайкина В.Н. на тему «Экспериментальное обоснование персонализированного дозирования антибактериальных препаратов для интравитреального введения в лечении острых послеоперационных эндофтальмитов».

С 2021 года по настоящее время занимает должность заместителя генерального директора по научно-клинической работе АО Екатеринбургский центр «МНТК Микрохирургия глаза».

Автор и соавтор 40 научных работ, из них 31 в рецензируемых журналах ВАК Минобрнауки РФ, автор и соавтор 6 патентов на изобретение, 6 рационализаторских предложений.