

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«УРАЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Пономарев Вячеслав Олегович
ЛЕЧЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ ГЛАЗА С ПОМОЩЬЮ
КОНЬЮГАТОВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ (КВАНТОВЫХ ТОЧЕК)

3.1.5 – Офтальмология
3.3.6 – Фармакология, клиническая фармакология

диссертация на соискание учёной степени
доктора медицинских наук

Научные консультанты:
доктор медицинских наук
Казайкин Виктор Николаевич

Доктор медицинских наук, профессор
Омельяновский Виталий Владимирович

Екатеринбург – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
----------------------	----------

Глава 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ГЛАЗА, ПРОБЛЕМЫ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ РАЗРЕШЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	21
---	-----------

1.1. Современное представление о терапевтическом и хирургическом подходах в лечении бактериальных кератитов.....	21
1.2. Современное состояние проблемы лечения бактериальных эндофтальмитов.....	31
1.3. Антибиотикотерапия в офтальмологии. Существующие проблемы и перспективы решения	38
1.4. Области применения наночастиц (квантовых точек) в офтальмологии, их структурная и динамическая организация.....	53

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ КЛИНИКО- ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫХ, ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ И ФАРМАКОЭКОНОМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	64
---	-----------

2.1. Дизайн исследования.....	64
2.2. Ретроспективные исследования.....	66
2.3. Фундаментальные исследования.....	67
2.4. Клинико-лабораторные исследования.....	79
2.5. Цитогистоморфологические исследования.....	84
2.6. Фармакоэкономические исследования.....	91
2.7. Статистические и математические методы обработки данных.....	104

Глава 3. РЕТРОСПЕКТИВНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ МИКРОФЛОРЫ С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И АНАТОМИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ.....	105
3.1 Клинико-функциональные и анатомические результаты лечения бактериальных инфекций переднего отрезка глаза, влияние микрофлоры с множественной лекарственной устойчивостью на исходы лечения	105
3.2 Клинико-функциональные и анатомические результаты лечения бактериальных инфекций заднего отрезка глаза, влияние микрофлоры с множественной лекарственной устойчивостью на исходы лечения	108
 Глава 4. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ, БИОЛОГИЧЕСКИХ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КВАНТОВЫХ ТОЧЕК И КОНЬЮГАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ	112
4.1. Разработка и синтез квантовых точек для офтальмологического применения.....	113
4.2. Исследование способности квантовых точек к генерации активных форм кислорода и скорости их образования при облучении светом в видимом диапазоне длин волн и при изменении pH среды	121
4.3. Результаты исследования физического взаимодействия и фармакокинетики квантовых точек с бактериальной клеткой	130
4.4. Синтез и исследование конъюгатов на основе квантовых точек и антибиотиков, используемых в офтальмологической практике.....	148
4.5. Анализ влияния внешних факторов на активность квантовых точек....	159
4.5.1. Анализ влияния температурных изменений на клиническую активность квантовых точек.....	159
4.5.2. Анализ влияния биологического окружения на клиническую активность квантовых точек.....	161

4.6. Возможности стерилизации квантовых точек с помощью трековых мембран для офтальмологического использования.....	164
---	-----

ГЛАВА 5. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ И ЦИТОГИСТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК И КОНЬЮГАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ.....	168
---	------------

5.1. Анализ антибактериальной активности квантовых точек и конъюгатов на их основе в отношении антибиотикорезистентных возбудителей инфекционных офтальмологических заболеваний <i>in vitro</i>	169
---	-----

5.2. Доклиническая эффективность разработанной технологии лечения инфекционного поражения глаза с помощью квантовых точек и конъюгатов на их основе вызванного антибиотикорезистентной грамотрицательной и грамположительной микрофлорой на лабораторных животных.....	188
--	-----

5.2.1. Результаты моделирования и разработки экспериментального лечения инфекционного поражения роговицы вызванного антибиотикорезистентной грамотрицательной микрофлорой.....	188
--	-----

5.2.2. Результаты моделирования и разработки экспериментального лечения инфекционного поражения роговицы вызванного антибиотикорезистентной грамположительной микрофлорой.....	196
--	-----

5.2.3. Результаты моделирования и разработки экспериментального лечения инфекционного поражения внутренних оболочек глазного яблока, вызванного антибиотикорезистентной грамотрицательной микрофлорой..	205
---	-----

5.2.4. Результаты моделирования и разработки экспериментального лечения инфекционного поражения внутренних оболочек глазного яблока, вызванного антибиотикорезистентной грамположительной микрофлорой.....	214
--	-----

5.3. Анализ доклинической (анатомической и функциональной) безопасности применения квантовых точек и конъюгатов на их основе в разработанной технологии лечения антибиотикорезистентных инфекций глаза.....	221
---	-----

5.4. Анализ клеточной и тканевой безопасности применения квантовых точек и конъюгатов на их основе в разработанной технологии лечения антибиотикорезистентных инфекций глаза.....	243
---	-----

Глава 6. ФАРМАКОЭКОНОМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.

РАЗРАБОТКА ТРЕБОВАНИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА.....262

6.1. Требования для создания лекарственного препарата с использованием квантовых точек и конъюгатов на их основе для применения в офтальмологической практике.....	262
--	-----

6.2. Разработка системы фармакотерапии антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза на основании новой технологии лечения.....	266
--	-----

6.3. Фармакоэкономический анализ новой технологии лечения бактериальной антибиотикорезистентной инфекции глаза.....	274
---	-----

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	292
-----------------	-----

ВЫВОДЫ.....	313
-------------	-----

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	315
--------------------------------	-----

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	316
------------------------	-----

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	346
---------------------------------------	-----

ПРИЛОЖЕНИЯ.....	348
-----------------	-----

ВВЕДЕНИЕ

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 зрительного анализатора, 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 характеризуются 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; Kuhn F. et al., 2006; Малиюгин 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; Sisinty 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 гено типе 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. et 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 являются 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 академии 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.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обусловлена достаточным объемом лабораторного материала, количеством экспериментальных животных, однородностью выборки субъектов, применением современных методов исследования, адекватных методов биомедицинской статистики и полным теоретическим обоснованием полученных данных.

Полученные результаты обработаны с применением математических методов статистического анализа, результаты достоверны и аргументированы.

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 Всероссийской 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, 2016); 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); 20-м Всероссийском 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, 2022); Всероссийской конференции «Воспаление глаза» (Москва, 2021); XXIX Научно-практической конференции офтальмологов (Екатеринбург, 2021); 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).

Личное участие автора

Автором осуществлялось планирование, набор и получение исходных данных, личное выполнение теоретических и экспериментальных разделов диссертационного исследования, в том числе выполнение хирургических вмешательств у различных групп экспериментальных животных, обобщение, статистическая обработка и интерпретация полученных данных. Личный вклад автора состоит в анализе результатов исследования, подготовке основных публикаций по выполненной работе, оформлении текста докторской диссертации. Доля участия автора в получении материала составляет более 85%, в обобщении и анализе данных – 100%.

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, 1 свидетельство о государственной регистрации базы данных.

Патенты

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 мягкой контактной линзы на квантовых точках / 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.

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 «Нanomатериалы 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).

Глава 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ГЛАЗА, ПРОБЛЕМЫ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ РАЗРЕШЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Общеизвестно, что инфекционные заболевания глаза могут быть обусловлены разнородными царствами живых организмов (бактерии, грибы, вирусы, простейшие и др.), однако с практической точки зрения клиницисту крайне сложно охватить многогранную проблематику лечения инфекционных офтальмологических заболеваний, что требует фокуса на отдельных ее разделах. Учитывая данные аспекты, диссертационный обзор сконцентрирован на бактериальных процессах, затрагивающих передний и задний отрезки глазного яблока, в силу частоты их встречаемости в области практического здравоохранения, хирургической практики и уровня осложнений, вызываемых патологическими процессами бактериальной этиологии.

1.1. Современное представление о терапевтическом и хирургическом подходах в лечении бактериальных кератитов

На сегодняшний день проблема непосредственного лечения бактериальных кератитов (БК) фокусируется вокруг возможности назначения этиотропной терапии в отношении возбудителя, вызывающего инфекционное поражение роговицы.

Для офтальмологов с богатым опытом клинической работы, особенно занимающихся своей профессиональной деятельностью в медицинских организациях стационарного звена, имеется больше шансов провести классическую иррадикацию возбудителя. Однако амбулаторное звено, являясь основным буфером пациентов данного профиля, зачастую сталкивается с

невозможностью проведения адекватной дифференциальной диагностики в силу ряда причин, и придерживается классических схем лечения.

Сегодняшним «золотым» стандартом лечения БК является использование различных путей доставки антибиотиков (АБ) широкого спектра действия, как правило, назначаемых эмпирически и не требующих идентификации возбудителя, глюкокортикостероидов, кератопротекторов [179].

Местная антибактериальная терапия характеризуется максимальной незамедлительностью. Возможны различные варианты сочетания АБ разных групп: монотерапия фторхинолонами (Ципрофлоксацин 0,3%, Офлоксацин 0,3% или Левофлоксацин 1,5%) или комбинированная (Цефазолин или Ванкомицин 25-50 мг/мл + Тобрамицин 0,3% или Гентамицин 0,3%). Для стартовой терапии чаще отдается предпочтение комбинированным АБ, особенно при значительной инфильтрации роговицы. Наряду с хорошей клинической эффективностью современных АБ, нельзя не отметить нарастающую устойчивость к ним патогенной микрофлоры, причем неоднородную у разных штаммов. Например, в исследовании Termote K. с соавт. (2018) при ретроспективном анализе 238 случаев БК было выявлено, что чувствительность грамотрицательных бактерий к антибиотикам широкого спектра с течением времени не менялась и оставалась высокой, в то время как грамположительные бактерии оставались к ним менее восприимчивыми и чаще мутировали [144]. В исследовании Jin H. с соавт. (2017) ретроспективный анализ 96 случаев БК показал, что все грамотрицательные микроорганизмы (35; 36,8%) оказались чувствительными к Цефтазидиму, Тобрамицину и Фторхинолонам, в то время как грамположительные микроорганизмы (57,1%) проявили к ним широкий спектр устойчивости, включая 4 случая идентифицированных коагулазонегативных стафилококков (из 15; 27%), резистентных даже к фторхинолонам (Левофлоксацину) [115].

Частота инстилляций АБ зависит от тяжести кератита: при небольших неокрашивающихся периферических язвах закапывание начинают с

различными интервалами (от 2 до 6 часов), при воспалительной реакции в передней камере – каждые 30-60 минут круглосуточно. При тяжёлых язвах используется пульс-терапия в виде инстилляций с 5-минутным интервалом в течение 30 минут и дальнейшим снижением частоты закапывания до «стандартной», в зависимости от клинического ответа, – обычно до 4-5 раз в сутки в течение 7-10 дней [169].

Недостатком эпибульбарной (топической) антибиотикотерапии является частота инстилляций для поддержания необходимой концентрации лекарственного препарата. При закапываниях со слезной жидкостью теряется около 80% лекарственного вещества. Для решения этой проблемы при риске внутриглазного распространения инфекции могут быть эффективны мягкие контактные лечебные линзы с фторхинолонами. При их использовании в камерной влаге достигаются более высокие концентрации антибактериального вещества, и обеспечивается более длительный лечебный эффект [9, 12].

При глубоком распространении инфекции могут быть эффективны антибактериальные лекарственные плёнки (с Гентамицином, Неомицином, Левофлоксацином, Моксифлоксацином). В работе Гайсиной Г.Я. (2016) в экспериментальной модели экзогенного иридоциклита, вызванным *St. aureus*, применение глазных пленок с Моксифлоксацином на основе поливинилового спирта продемонстрировало высокую эффективность в отношении купирования признаков воспалительного процесса, а также обеспечивало длительное (в течение 20 часов) поддержание в передней камере концентрации антибиотика до 3,0 мкг/мл [9].

При угрозе распространения инфекции на склеру применяется субконъюнктивальное введение антибиотиков: Гентамицин (4%, 0,5 мл 1-2 раза в сутки) или Линкомицин (1-2 раза в сутки). Как при склеральном и внутриглазном распространении инфекции, так и при риске перфорации или системной инфекции, может быть использована системная антибактериальная терапия [144].

Вопрос применения местных кортикостероидов в настоящее время является дискуссионным. С одной стороны, кортикостероиды способны подавлять воспаление и препятствуют последующему рубцеванию роговицы. С другой стороны, способствуют рецидиву инфекции, локальной иммуносупрессии и ингибированию синтеза коллагена, что предрасполагает к кератомалиции. Кроме того, длительное применение кортикостероидов зачастую приводит к повышению внутриглазного давления. Но, по мнению большинства авторов, добавление кортикостероидов к местной антибактериальной терапии не демонстрировало серьёзных различий клинических исходов лечения [257, 226, 58, 105].

Так, в исследовании SCUT (Steroids for Corneal Ulcers Trial, стероиды для лечения язв роговицы) дополнительное назначение 1% преднизолона фосфата к терапии антибиотиками широкого спектра не влияла на эффективность лечения БК, как, впрочем, не влияла и на выраженность побочных эффектов, характерных для кортикостероидов [221]. В исследовании Ray K.J. с соавт. (2014) отсроченное назначение местных кортикостероидов – в сроки 48-72 часов после начала антибиотикотерапии – приводило к улучшению остроты зрения на 1 строку через 3 месяца наблюдения по сравнению с группой плацебо [197]. При подгрупповом анализе SCUT эффективности лечения кератита, вызванного *Ps. aeruginosa*, дополнительное назначение кортикостероидов также выявило улучшение зрительных функций при повторном осмотре через 3 месяца. При кератите, вызванном грамположительными бактериями рода *Нокардия* (*Nocardia*), по данным того же SCUT (2014) и Lalitha P. с соавт. (2012), назначение кортикостероидов приводило к ухудшению зрения [221, 140].

При терапии местными кортикостероидами (инстилляцией/субконъюнктивальные инъекции) важен принцип минимального дозирования, необходимого для достижения контроля воспаления. Оптимальное использование кортикостероидов во многом зависит от индивидуальной реакции заболевания на терапию, тщательного наблюдения и своевременной

коррекции назначенных препаратов. При лечении бактериальных язв применение кортикостероидов ограничено до тех пор, пока микроорганизм не будет идентифицирован, эпителиальный дефект не заживет и/или язва не консолидируется [229]. В любом случае кортикостероидов следует избегать в случаях *Acanthamoeba* и *Nocardia*.

Несмотря на широкий арсенал, достаточно эффективных местных АБ, существуют резистентные формы БК, трудно поддающиеся консервативному лечению. Кроме того, в составе АБ, применяемых в виде глазных капель и мазей, содержатся консерванты, негативно влияющие на состояние роговицы и слезной плёнки. Консерванты могут способствовать повреждению переднего эпителия роговицы, препятствовать её регенерации (особенно при длительном использовании), а также угнетению факторов неспецифической защиты слезной жидкости (Лизоцим, Лактоферрин, β -лизин) и факторов иммунологической реактивности (иммуноглобулины А, G, М, D и E) [194, 8].

Учитывая аспекты антибиотикорезистентности, подбора подходящего АБ и характера течения микробного процесса, при дальнейшем прогрессировании БК существует риск перфорации роговицы, а также риск распространения инфекции на склеру или глубже лежащие структуры глаза с высокой вероятностью необратимых функциональных нарушений или анатомической гибели глаза. При отсутствии эффекта от проводимой консервативной терапии, прогрессировании патологического процесса необходим своевременный переход лечения на другие лекарственные средства или выполнение оперативного вмешательства [33].

Потенциальным методом лечения осложненных бактериальных инфекций глаза является использование ингибиторов матриксных металлопротеиназ. Матриксные металлопротеиназы относятся к семейству внеклеточных протеиназ и играют важную роль в физиологических и патологических процессах, таких как эмбриогенез, репарация тканей, неоангиогенез, опухолевая трансформация и метастазирование при различных злокачественных заболеваниях. Эти ферменты способны разлагать все виды

белков внеклеточного матрикса, в частности, коллаген. Ингибиторы матриксных металлопротеиназ применяются в качестве терапевтических средств в ревматологии, онкологии, неврологии, кардиологии [38].

В офтальмологии ингибиторы матриксных металлопротеиназ были предложены в качестве дополнительной терапии при лечении язв роговицы в конце 1980-х годов, поскольку предполагалась их потенциальная способность предотвращать стромальное разрушение в роговице, хотя каких-либо рандомизированных когортных исследований для доказательства их эффективности при бактериальном кератите до настоящего времени не проводилось. Доксциклин (полусинтетический тетрациклин, бактериостатический антибиотик широкого спектра действия) – единственный ингибитор матриксных металлопротеиназ, который использовался в различных экспериментальных исследованиях, например, при рецидивирующих эрозиях роговицы и микробном кератите у людей. McElvanney A.M. с соавт. (2003) сообщили о двух случаях эффективного лечения бактериального кератита, вызванного *P. aeruginosa*, при пероральном приёме Доксциклина 100 мг два раза в день в дополнение к инстилляциям Офлоксацина 0,3% и Цефтазидима 5%. В обоих случаях наблюдалась стабилизация кератомалации [158].

Использование антиметаболитов, в качестве средств лечения бактериальных инфекций роговицы также представляет особый интерес. Митомицин С, выделенный из актинобактерии *Streptomyces caespitosus*, превращается в тканях в алкилирующий агент и приводит к алкилированию ДНК на всех фазах клеточного цикла, обуславливая нарушение структуры клетки, подавляет её митоз, запускает в поврежденной клетке механизм апоптоза [249]. Митомицин С использовался в рефракционной хирургии для уменьшения послеоперационного помутнения роговицы и рубцевания из-за его антифибробластной активности [61, 86]. Kwan B.W. с соавт. (2015) обнаружили, что препарат обладает также антимикробной активностью

широкого спектра действия в отношении множества бактерий, включая *E. coli*, *S. aureus* и *P. aeruginosa*, в любых питательных средах [139].

В качестве одного из перспективных методов лечения микробных кератитов на сегодняшний день рассматривается процедура кросслинкинга роговичного коллагена (Corneal Cross-Linking – CXL), который широко и успешно используется при прогрессирующих кератэктазиях. Антибактериальный эффект вмешательства объясняется действием рибофлавина и ультрафиолетового излучения. При фотоактивации рибофлавина высвобождаются активные формы кислорода, воздействующие на нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) и клеточные мембраны микроорганизмов. Ультрафиолетовое излучение также обладает выраженным антимикробным действием, повреждая ДНК и РНК микроорганизмов и препятствуя их размножению. За счет увеличения количества интра- и интерфибриллярных ковалентных связей межклеточного матрикса при кросслинкинге повышается устойчивость стромы к воздействию протеолитических ферментов [239, 93, 157, 203, 199]. Более того, существует ряд работ, демонстрирующих эффективность данного подхода при широком видовом многообразии возбудителей, в том числе антибиотикорезистентных, при различных клинических ситуациях. Помимо антимикробного эффекта и усиления биомеханической прочности роговицы, проведение кросслинкинга повышает её устойчивость к бактериальным ферментам, ответственным за разрушение коллагена. Все перечисленные механизмы обеспечивают ослабление симптомов БК: уменьшение болевого синдрома, отечности роговицы и признаков активной воспалительной реакции. [258, 259, 166, 112, 152, 153, 84, 99, 134, 205, 236, 49, 204].

Также необходимо рассмотреть вопросы применения микродиатермокоагуляции в аспекте терапии БК – это прижигание тканей переменным током высокой частоты, при котором, в отличие от термокоагуляции, процесс заживления роговицы протекает значительно быстрее, а образующийся рубец морфологически близок нормальной

структуре. Для лечения воспалительных заболеваний роговицы данная методика применяется с 50-х гг. XX века. По данным Каспарова А.А., микродиатермокоагуляцию при БК (помимо вирусных кератитов) показана при начальных и развитых проявлениях гнойной инфекции роговицы и при гнойной инфильтрации на фоне герпетической язвы (как наложение суперинфекции), причём в качестве ургентного вмешательства. При всей несомненной эффективности микродиатермокоагуляции применение метода ограничивается глубиной изъязвления до 30% толщины роговицы и не более 5 мм в диаметре. При язвах, захватывающих более 50% толщины стромы, возрастает риск повреждения глубоких слоев, развития десцеметоцеле и перфорации. Микродиатермокоагуляция может привести к истощению регенерационных механизмов, проблемной и неэффективной регенерации и рецидивам заболевания [18, 25, 4, 21, 22, 20].

Непосредственный интерес также представляют цианоакрилаты – сложные эфиры цианоакриловой кислоты, которые используются в качестве тканевого клея при закрытии угрожающих или открытых перфораций роговицы, чтобы избежать или отсрочить проведение сквозной кератопластики [247, 57, 133].

Eiferman R.A. с соавт. (1983) сообщили о бактериостатическом действии бутил-2-цианоакрилатного клея *in vivo* и *in vitro* в отношении грамположительных бактерий. Активность этого клея, по данным авторов, на грамотрицательные микроорганизмы отсутствовала [82]. В исследовании De Almeida Manzano R.P. с соавт. (2006) была выявлена хорошая бактерицидная активность этилцианоакрилата *in vitro* на *Str. pneumoniae*, в отношении других видов она была слабой, и отсутствовала при взаимодействии со всеми штаммами *Ps. aeruginosa* [75]. Исследование Rohan Bir Singh с соавт. (2020) продемонстрировало умеренную краткосрочную протекторную эффективность цианоакрилатного клея, которая позволяла отсрочить кератопластику на 6 месяцев. По данным тех же авторов, применение цианоакрилатного клея, позволяло использовать местные кортикостероиды

для подавления активного воспалительного процесса и последующего рубцевания роговицы [216].

Подобные результаты были получены группой авторов под руководством Jia Yin с соавт. (2019) при лечении 137 пациентов с БК, также осложнённым истончением/перфорацией роговицы. Авторы отмечали, что целостность клеевой плёнки со временем нарушалась, что в некоторых случаях исправлялось дополнительными аппликациями [262].

На сегодняшний день также активно используется трансплантация амниотической мембраны – является внутренней плодной оболочки, обладающей высокой биосовместимостью, антибактериальной активностью, угнетающей ангиогенез, фиброз, и воспаление. Амниотическая мембрана содержит несколько факторов роста, которые делают её отличным естественным кандидатом для ускорения регенерации и заживления ран [154, 79, 141].

При лечении инфекционных язв роговицы в зависимости от глубины поражения нашли применение как однослойные, так и многослойные трансплантаты амниотической мембраны. Для её фиксации используются швы или фибриновый клей, при этом мембрана со временем постепенно интегрируется в роговичную ткань [141, 174, 222, 64, 165, 89, 214].

Аутоконъюнктивальная пластика – простой и эффективный способ лечения прогрессирующих язв роговицы, особенно периферической локализации. При наличии дефекта в оптической зоне данный метод стоит рассматривать скорее как временный или подготовительный перед сквозной кератопластикой, в силу отсутствия зрительных функций. Это один из старейших методов лечения перфорации роговицы, когда выполнение сквозной кератопластики не представляется возможным [30, 127].

Наиболее радикальный метод борьбы с инфекционным кератитом – кератопластика, а именно выполнение сквозной лечебной или послойной кератопластики. Возможна и оптическая кератопластика – для восстановления или улучшения зрения путем замещения помутневшей ткани роговицы

прозрачной, но в стадии выздоровления. Кератопластика – неотложное органосохраняющее хирургическое вмешательство, основной целью которого является иссечение инфекционного очага роговицы и её восстановление за счет трансплантации донорской роговичной ткани. Показаниями для проведения срочной лечебной кератопластики при развитых инфекционных кератитах являются: неконтролируемое прогрессирование гнойного инфильтрата роговицы, несмотря на максимально активное медикаментозное лечение; распространение гнойной инфекции на лимб с воспалением склеры; 3) угроза перфорации или перфорация роговицы [78]. Несомненно, выбор вида кератопластики зависит от стадии гнойного язвенного процесса и от вида патогена, вызвавшего его. Так, прогрессирование гнойной язвы роговицы, вызванной синегнойной палочкой, через 24-48 часов после начала активного консервативного лечения служит неотложным показанием для проведения сквозной КП [19, 155, 129, 212, 137, 23].

Рецидивы инфекционного кератита после лечебной кератопластики развиваются в отсроченном периоде – от 4 дней до 1 года, наиболее часто – через 6 недель [234, 215, 65, 43]. По данным Каспаровой Е.А. (2016), ранняя лечебная кератопластика, проведенная до развития перфорации роговицы и/или перехода гнойного процесса на лимб и склеру, позволяет не только спасти глаз как орган, но и добиться лучших функциональных результатов и снизить частоту послеоперационных осложнений [21].

Более того, у пожилых пациентов с исходно низкой остротой зрения функциональные и анатомические результаты лечения остаются крайне низкими [237, 223, 235, 172, 105].

Бактериальные кератиты до настоящего времени являются актуальной проблемой офтальмологии. Заболевание имеет широкое распространение, существенно варьирует в зависимости от географического региона, даже в пределах одной страны. Эпидемиология БК в РФ постоянно изучается, но в литературе можно встретить ограниченное число публикаций, посвящённых этому вопросу. Увеличение численности населения, продолжительности

жизни и урбанизация, проблемы загрязнения окружающей среды, внутривидовые мутации патогенов, бесконтрольное применение антибиотиков и иммунодепрессантов, в своей совокупности являются причиной снижения защитных механизмов системного и местного характера макроорганизмов, смены внутривидового состава возбудителей, а также повышения общего профиля антибиотикорезистентности в составе микробиомов [32, 102, 107, 118, 128, 198, 53, 148, 161].

Несомненные успехи в диагностике и лечении БК позволяют с уверенностью говорить о высокой вероятности благоприятного исхода патологического процесса, однако резистентные формы БК по-прежнему вызывают функциональные и анатомические угрозы для зрительного анализатора. Несомненно, данная проблематика требует комплексного решения, направленного на разработку новых стратегий лечения.

Не менее актуальную проблему представляют собой инфекционно-воспалительные заболевания заднего отрезка глаза, драматичность исходов которых конкурентно занимает лидирующие позиции по рискам потери глазного яблока как органа в исходе патологического процесса. Современные аспекты лечения эндофтальмита представлены в следующем разделе обзора литературы.

1.2. Современное состояние проблемы лечения бактериальных эндофтальмитов

Острый бактериальный послеоперационный эндофтальмит (ОЭ) является разрушительной внутриглазной инфекцией с тенденцией к увеличению заболеваемости и распространенности. Этому явлению способствует «общемировая глобальная тенденция старения». По данным ВОЗ и ООН, к 2050 году средняя продолжительность жизни увеличится на 10 лет, что неминуемо приведет к росту острых, хронических и инвалидизирующих заболеваний. В свою очередь, общемировой рост

хирургической активности в совокупности с увеличением продолжительности жизни населения не уменьшает процент встречаемости ОЭ среди населения развитых стран, несмотря на бурное развитие технологий [256, 227, 138]. На сегодняшний день частота встречаемости варьирует от 0,59 до 0,039% в лучших мировых офтальмологических клиниках [52].

Современные подходы к комплексному лечению острых бактериальных послеоперационных эндофтальмитов подробно описаны в исследованиях EVS 1995 и ESCRS 2013, где отражены два основных стандарта лечения: «золотой» и «серебряный». «Золотой стандарт» включает проведение 3-портовой витрэктомии с посевом содержимого передней камеры и витреальной полости на микрофлору и интравитреальное введение АБ на завершающем этапе операции в течение 1 часа после диагностирования острого эндофтальмита. Выполнение «Серебряного стандарта» приемлемо при отсутствии витреоретинальной операционной и подготовленного хирурга, т.е. в тех случаях, когда полноценное витреоретинальное вмешательство не представляется возможным. Тогда лечебно-диагностические манипуляции могут быть выполнены с помощью автоматического портативного витреотома 23Ga (интректора 23Ga). С его помощью проводится пункция передней камеры и биопсия стекловидного тела с последующим введением вышеописанных антибактериальных препаратов [27, 59, 1]. В свою очередь, наименее эффективным способом забора содержимого витреальной полости может явиться «сухая» аспирация стекловидного тела с помощью иглы. Если ликвидация стекловидного тела минимальна, игольчатая биопсия невозможна. В таких случаях последующее направление пациента в специализированное учреждение является благоразумным.

Основные трудности в лечении связаны с тем, что манифестация и клиническое течение заболевания протекает молниеносно, а промедление в сроках выполнения лечебных мероприятий значительно снижает шанс получить положительные анатомические, а тем более высокие функциональные результаты. Кроме того, высоковирулентная патогенная

флора, инициирующая каскад патологических реакций, подвергается химиотерапии эмпирически, до момента получения результатов микробиологической диагностики, а в некоторых случаях является устойчивой к проводимой антибактериальной химиотерапии, что значительно влияет на исходы лечения. Общепринято, что применяемые химиотерапевтические агенты должны максимально перекрывать весь спектр возможных возбудителей инфекции, а единственный путь их адекватной доставки – это интравитреальная инъекция [187, 55]. Только таким образом происходит прямой доступ лекарственного вещества к патологическому очагу, минуя гематоофтальмический барьер, создается наибольшая концентрация препарата в течение длительного периода времени [240].

В настоящее время не существует АБ, которые перекрывали бы весь спектр бактериальной микрофлоры – грамположительной и грамотрицательной. Поэтому для гарантированного эффекта предпочтительнее комбинированное введение АБ.

Традиционно для эрадикации грамположительной флоры используется интравитреальная инъекция 1 мг/0,1 мл ванкомицина, который обладает достаточно широким спектром действия, минимальной резистентностью, приемлемыми темпами стерилизации и минимальной токсичностью [100]. Однако в литературе описаны случаи резистентности к ванкомицину, в основном это касается энтерококковых эндофтальмитов [83, 47, 231]. Среди эндогенных инфекций также встречаются ванкомицин-резистентные штаммы стафилококка, стрептококка и энтерококка [67, 238, 90, 173, 76]. Отдельного внимания заслуживает VISA – Vancomycin Intermediate Staphylococcus Aureus – золотистый стафилококк с промежуточным уровнем устойчивости к ванкомицину. Формально минимальная подавляющая концентрация ванкомицина для таких штаммов соответствует значениям, интерпретируемым как умеренно-резистентные. Для эрадикации таких штаммов необходимы большие ее значения, чем в стандартных условиях. Необходимо отметить, что наличие *mecA* гена, обуславливающее

метициллин-резистентность у стафилококков, совершенно не является необходимым условием проявления того или иного уровня резистентности к ванкомицину. Так, в лабораторных экспериментах было показано, что резистентность к ванкомицину продолжает проявляться у штаммов стафилококка и после «вырезания» *mecA* гена из генома бактериальной клетки. Тот факт, что резистентность к ванкомицину обнаружена лишь у штаммов метициллин-резистентного золотистого стафилококка (MRSA), вероятно, объясняется высокой значимостью длительного применения ванкомицина в селекции резистентных штаммов, так как, очевидно, что ванкомицин гораздо чаще применяется для лечения инфекций, вызванных MRSA, чем метициллин-чувствительными *S. aureus*, в отношении которых проявляют активность многие другие антибактериальные препараты [109].

Тем не менее, в большинстве случаев послеоперационный эндофтальмит вызывается грамположительной флорой, что делает ванкомицин препаратом первого выбора при подозрении на послеоперационную бактериальную инфекцию [218, 190]. Ванкомицин относится к АБ с время-зависимым эффектом (временной интервал, в течение которого его концентрация поддерживается выше минимальной подавляющей для конкретных возбудителей) [142]. Это означает, что достижение оптимальной терапевтической концентрации может достигаться не за счёт увеличения дозы, а за счёт увеличения кратности инъекций. Увеличение дозы может привести к повышенному риску ретинотоксичности [192]. Сегодня на рынке доступны более новые антибиотики для лечения ванкомицин-резистентных интраокулярных инфекций, которые обладают высоким профилем безопасности, однако исследования ограничены доклиническими испытаниями. Тем не менее, демонстрируют перспективность данного направления [69].

Грамотрицательная флора представляет не меньший интерес для клиницистов, учитывая факт молниеносности развития клинической картины и драматичности последствий перенесенного бактериального эндофтальмита,

вызванного, например, синегнойной инфекцией. Традиционно для лечения ОЭ, вызванных грамотрицательной инфекцией, используются интравитреальные инъекции цефалоспоринов и аминогликозидов. Однако макулярная токсичность амикацина, а тем более гентамицина (аминогликозиды), делает предпочтительной инъекцию 2,25 мг/0,1 мл цефтазидима (цефалоспорина третьего поколения) [56].

Несмотря на высокую терапевтическую активность цефтазидима, исследуются новые препараты, обладающие широкой терапевтической активностью и высоким профилем безопасности. Один из них – пиперациллин-тазобактам, доза 250 мкг/0,1 мл которого, по данным проведенных исследований, является безопасной и может рассматриваться как альтернатива современным химиотерапевтическим агентам [178, 181].

В свою очередь, наличие базовых знаний по фармакокинетике АБ позволяет правильно расставлять терапевтические акценты. Например, путь эвакуации АБ зависит от размера молекулы препарата. Ванкомицин, аминогликозиды, макролиды, рифампицин, имеют большой размер молекулы и покидают витреальную полость путем пассивной диффузии через переднюю камеру и шлеммов канал. В свою очередь, препараты с меньшим размером молекул, такие как бета-лактамы и фторхинолоны, покидают интраокулярные структуры путем активного транспорта через ретинальный пигментный эпителий. Катионные препараты, такие как ванкомицин, аминогликозиды, рифампицин и эритромицин, покидают глаз путем пассивной диффузии через передний отрезок. Анионные, такие как бета-лактамы, цефалоспорины и клиндамицин, покидают глаз через задний отрезок, за счет активного транспорта. Непосредственное влияние на эвакуацию АБ оказывают молекулярная масса, степень разжижения стекловидного тела, коэффициент растворимости препарата, степень воспаления глазного яблока, состояние иридохрусталиковой диафрагмы и витреальной полости (факия, афакия, артифакия, авитрия, силиконовая тампонада), плотность раствора с разведённым АБ и многое другое [54, 68, 182, 103, 117].

Таким образом, основываясь на данных современной литературы, интравитреальное введение (ИВВ) антибактериальных препаратов является основным и необходимым действием в лечении бактериального ОЭ.

Другим важным звеном лечения является проведение витреоретинального вмешательства, во время которого удаляется патологический субстрат из полости глаза, а именно: инфекционные агенты с собственными токсинами и медиаторы воспаления, способные приводить к необратимому повреждению фоторецепторов даже при стерильном состоянии содержимого полости глаза [17]. EVS рекомендовало выполнять витрэктомию только в случаях снижения остроты зрения до светоощущения [201]. Однако анализ более поздних клинических наблюдений (ESCRS), указывает на то, что полноценное витреоретинальное вмешательство, несмотря на риск интра- и послеоперационных осложнений, приводит к более высоким функциональным результатам [224, 81, 136, 52, 135].

Особый интерес при лечении ОЭ представляет использование заместителей стекловидного тела. В отечественной литературе описаны положительные анатомические и функциональные результаты лечения бактериальных эндофтальмитов с применением субтотальной витрэктомии с силиконовой тампонадой на завершающем этапе операции даже без интравитреального введения антибиотиков. Патогенетичность метода обосновывалась авторами как попытка блокирования полости, в которой могут накапливаться продукты воспаления, и тем обстоятельством, что, по их мнению, силиконовое масло обладает бактериостатическим эффектом. Удаление силиконового масла при этом производится через 3-4 месяца [26, 14]. По данным некоторых литературных источников, силиконовое масло действительно обладает некоторым бактериостатическим эффектом, но этот эффект незначительный, и не может рассматриваться как лечебное средство [66]. Показаниями для силиконовой тампонады являются случаи крайне тяжелых эндофтальмитов с низкой прогнозируемой остротой зрения, как

дополнительное средство к антибиотикотерапии, а также ретинальные разрывы и отслойка сетчатки [233, 91, 193, 217, 252, 48, 265].

Использование заместителей стекловидного тела существенно влияет на фармакокинетику химиотерапевтических агентов, поскольку изменяются объём внутриглазной жидкости в витреальной полости и пути эвакуации химиотерапевтических агентов. Проведенные исследования указывают на то, что концентрация АБ в витреальной полости увеличивается за счёт их скопления в преретинальном пространстве, вызывая токсическое повреждение сетчатки. Авторы рекомендуют снижать дозировки антибиотиков в 4 раза, для уменьшения риска ретинотоксичности [103].

Описаны также способы хирургического лечения эндофтальмитов с эндотампонадой перфторорганическими соединениями на завершающем этапе витрэктомии, с последующей его заменой на силиконовое масло через 10-14 дней. При их использовании авторы акцентируют внимание на блокировании среды для размножения бактериальной флоры [34].

В настоящее время идёт поиск наиболее эффективного алгоритма лечения острого бактериального эндофтальмита. Сейчас перед хирургами стоит задача не только подавления инфекции и сохранения глаза как органа, но и максимально возможное сохранение зрительных функций. Обязательным условием для достижения этих целей является правильное применение антибиотикотерапии, при которой должна решаться задача эффективного подавления патологической микрофлоры при минимальном воздействии на окружающие ткани, и, в первую очередь, на сетчатку. Для эффективного применения АБ важное значение имеют знания о спектре их воздействия на микрофлору, дозы, необходимые для подавления микрофлоры, не имеющие ретинотоксичности, а также фармакокинетика и фармакодинамика, определяющие пути и кратность введения АБ. Особо важное значение при этом должно отводиться вопросам антибиотикорезистентности, которые освещены в следующем разделе диссертационного обзора.

1.3. Антибиотикотерапия в офтальмологии.

Существующие проблемы и перспективы решения

Еще до момента понимания того факта, что многие человеческие заболевания могут вызваны болезнетворными микроорганизмами, ученые непримиримо вели борьбу со скрытой угрозой путем поиска веществ, способных избавить человеческий организм от болезней. Существуют документальные подтверждения первых попыток борьбы с микробной инфекцией в Древнем Египте, Греции и Китае [211]. Индейцы Южной Америки с доисторических времен использовали хинин в борьбе с малярией [15].

Однако научно обоснованная эпоха использования химических соединений в борьбе с инфекционным началом датируется лишь началом XVI века, в период наиболее активного становления микробиологии как важной научно-практической дисциплины.

В XVI веке известный немецкий естествоиспытатель и врач Парацельс (1493-1541) пытался применить мышьяк в борьбе с сифилисом, однако его опыты не увенчались успехом, и испытание этого вещества было надолго приостановлено. Примерно через 380 лет немецкий врач, бактериолог и биохимик, один из основоположников иммунологии и химиотерапии Пауль Эрлих (1854-1915) путем многочисленных экспериментов в 1912 году синтезировал Сальварсан, мышьяковистый препарат, способный *in vitro* губительно воздействовать на возбудителя сифилиса.

Сравнительно длительное время Сальварсан оставался единственным химиотерапевтическим средством, применяемым в борьбе с инфекциями, и заложил первый «кирпич» в фундамент нового и перспективного направления, которое будет стремительно развиваться в последующие годы.

Далее последовал период открытия сульфаниламидных препаратов, среди которых был Пронтозил (красный Стрептоцид) – первый эффективный препарат, оказывающий воздействие на стрептококковую инфекцию.

Впервые, в 1934 году немецкий бактериолог Г. Догмак обнаружил противококковое действие Стрептоцида (Аминобензосульфида) в опытах на лабораторных животных. Однако уже в 1935 году было доказано, что Пронтозил распадается в организме животных с образованием токсичного триаминобензола и высокоактивного амида сульфаниловой кислоты, не обладающих антибактериальной активностью [29].

В 1937 году в нашей стране был синтезирован Сульфидин, соединение близкое к Пронтозилу. Однако в дальнейшем этот препарат уступил место более эффективным сульфаниламидным препаратам, таким как Норсульфазол, Этазол, Фталазол и др.

Таким образом, сульфаниламидные препараты появились в арсенале клиницистов несколько раньше классических АБ, несмотря на это, они внесли неоценимый вклад в борьбе с генерализованными инфекциями, уносящими множество жизней, такими как менингит, сепсис, пневмония и многими другими.

Параллельно с использованием амидов в медицинской практике рос интерес к поиску биологически активных веществ, полученных биосинтетическим путем, т.е. соединений, образующихся в процессе жизнедеятельности разнообразных микроорганизмов [15].

Речь идет о том, что микроорганизмы вырабатывают некие вторичные метаболиты в чрезвычайно малых концентрациях, производство которых регулируется на уровне генома и позволяет им выдерживать межвидовую конкуренцию, путем агрессивного антагонизма с собратьями при дефиците питательных веществ. Это межвидовое взаимодействие позволяет решать ряд важнейших вопросов: приспособление к постоянно меняющимся условиям окружающей среды, борьбу за выживание и передачу генетической информации [95, 74].

Однако ученые того времени об этом только догадывались, что не мешало им делать выдающиеся открытия.

Л. Пастер и С. Джеберт в 1877 году сообщили, что аэробные бактерии подавляют рост *Bacillus anthracis*. В конце XIX века русский терапевт В.А. Моннасейн и дерматолог А.Г. Полотебнов выявили, что грибы из рода *Penicillium* способны задерживать рост микроорганизмов, вызывающих ряд некоторых кожных заболеваний человека. Лауреат Нобелевской премии И.И. Мечников в 1884 году обнаружил, что некоторые сапрофитные бактерии способны ингибировать рост патогенных микроорганизмов. В 1899 году Р. Гозио выделил кристаллическое соединение – микофеноловую кислоту, подавляющую рост бактерий сибирской язвы. В 1910-1913 годах О. Black и U. Alsberg выделили из гриба рода *Penicillium* пенициллиновую кислоту, обладающую антимикробными свойствами [15].

К сожалению, эти открытия не имели дальнейшего развития, в силу различных обстоятельств, тем не менее, они задали вектор развития для будущих научных изысканий.

Официальная эпоха АБ началась в 1940 году, когда выдающийся ученый и естествоиспытатель А. Флеминг с коллегами выделил Пенициллин в чистом виде. Однако история уходит в далекое прошлое, еще в 1922 году он совершил свое первое невероятное открытие, название которому дал его научный руководитель профессор А. Райт. Речь идет о Лизоциме (лизис – разрушение микроорганизмов) – органическом веществе, выделенном из человеческих тканей, обладающим антибактериальным эффектом. К сожалению, Лизоцим был малоэффективен, однако это открытие явилось стимулом для дальнейших экспериментов. В 1929 году А. Флемингу случайно удалось обнаружить грибок *Penicillium* – *P. Notatum*, который продемонстрировал способность ингибировать рост колонии стафилококков в чашке Петри. К сожалению, в больнице Св. Марии, где работал ученый, не было биохимиков, в результате чего не удалось выделить Пенициллин в пригодном для инъекций виде. Эту работу провели в Оксфорде Х.У. Флори и Э.Б. Чейн лишь в 1938 году. Естественно, понадобилось достаточно длительное время для проведения

лабораторных и клинических исследований. Таким образом, лишь в 1940 году удалось получить заветную субстанцию [85].

В нашей стране неоценимый вклад в области развития антибиотико- и противовирусной терапии внесла З.В. Ермолаева, выдающийся советский ученый, разработавший в 1942 году Пенициллин собственного производства (Крустозин), обладающий большей эффективностью, чем зарубежный аналог. Это подтолкнуло советскую химиотерапевтическую промышленность к своеобразному «буму» в области синтеза и выпуска высокотехнологичных химиотерапевтических препаратов, которые спасли миллионы жизней наших граждан в годы Великой Отечественной войны.

Интересным фактом является то, что сам термин «антибиотик» был придуман американским микробиологом Зельманом (др./ист. Сельман) Ваксманом для описания химических соединений, производимых различными микроорганизмами, способными оказывать антагонистическое воздействие на других представителей микромира [211].

С течением времени ученые были вынуждены уточнить природу понятия «антибиотик» в силу того, что это чрезвычайно широкая группа веществ, основной задачей которой является «действие против жизни».

Наиболее исчерпывающее понятие антибиотика дал Н.С. Егоров в 1986 году, где под этим термином понимаются специфические продукты жизнедеятельности микроорганизмов или их модификации, обладающие высокой физиологической активностью к определенным группам микроорганизмов (вирусам, бактериям, актиномицетам, грибам, водорослям, протозоа) или к злокачественным опухолям, избирательно задерживая их рост или подавляя их развитие [15].

В соответствии с этим фактом необходимо четко понимать, что, используя термин АБ, автор должен вкладывать в него уточняющую формулировку, что именно он имеет ввиду. В силу того, что противовирусный препарат семантически тоже является антибиотиком, как и Ципрофлоксацин

является антибиотиком, за исключением того, что это синтетический антибактериальный препарат.

Учитывая совокупное число лекарственных веществ, подходящих под это определение, можно сказать, что в последующие годы общее число АБ росло в геометрической прогрессии по всему земному шару. Это явление привело к эйфории в области лечения воспалительных заболеваний. В конце 1960-х беспрецедентные успехи заставили Американского хирурга генерала Уильяма Х. Стюарта сделать знаменитое заявление: «пришло время закрыть книгу об инфекционных заболеваниях и объявить войну против чумы выигранной» [219].

Естественно, в последующем влияние микробиологии и химиотерапии стало активно распространяться на так называемые «узкие» специальности, при этом офтальмология, конечно, не стала исключением в силу того, что воспалительные заболевания глаза и его придатков всегда представляли особый интерес и огромную проблему для клиницистов.

В начале XX века офтальмологи предпринимали все возможные попытки лечения тяжелых воспалительных заболеваний глаза, среди которых, одним из наиболее тяжелых был ОЭ. За неимением химических соединений, способных воздействовать на возбудителя инфекции, в 1910-1913 годы применяли вскрытие, механическое очищение, гальванокаутеризацию нагноившихся краев раны, промывание передней камеры раствором поваренной соли, «расщепление» роговой оболочки (скарификация некротизированной ткани), субконъюнктивальное «впрыскивание» поваренной соли. Патогенез лечения описывали следующим образом: через раздражение вызывался повышенный приток лейкоцитов и «соков» к очагу воспаления, которые в итоге брали на себя ответственность за борьбу с возбудителем инфекции [202].

В более поздние сроки (1918-1941 годы) патогенетически обоснованное «доантибиотическое» лечение пациентов с эндофтальмитом включало введение антисывороток (человеческой или животной сыворотки крови для

создания пассивного иммунитета), использование оксационида ртути (дезинфицирующий йодный раствор 1:5000 – 1:10000), капли водного раствора меркурохрома (ртутьорганическое соединение со слабым антисептическим эффектом), транспальпебральное прогревание воспаленного глазного яблока, вакцину против брюшного тифа в увеличивающихся дозах через день в сочетании внутримышечными инъекциями кипяченого молока (агрессивная иммуностимуляция), облучение воспаленных участков глазного яблока рентгеновскими лучами [98, 225].

Тем не менее, как правило, такие лечебные подходы приводили к генерализованному распространению инфекции и, как правило, к анатомической потере глаза как органа.

Революция в подходах к лечению ОЭ была достигнута за счет развития нескольких важнейших направлений. Во-первых, это понимание того, что деликатные манипуляции со стекловидным телом возможны. Первое сообщение о рассечении мембраны стекловидного тела с помощью иглы и удаление внутриглазного инородного тела пинцетом принадлежит А. Von Graefe (1863) [243, 244]. Почти полное удаление стекловидного тела было описано Kasner D. в 1968 году. Он удалил помутневшее стекловидное тело, используя доступ «открытое небо» [122, 121].

В 1971 году Machemer R. с соавт. разработали витреальный нож с инфузией и аспирацией для удаления стекловидного тела и одновременного его замещения сбалансированным солевым раствором [1515-1497]. В свою очередь Reuman G. с соавт. разработали специальный прибор – витреофаг (англ. Vitreophage), в котором стекловидное тело засасывалось в трубку, затем иссекалось внутренней осциллирующей трубкой по принципу гильотинного ножа [186]. O'Malley C. и Heints R. (1975) принадлежит концепция 3-портовой витрэктомии через плоскую часть цилиарного тела с использованием инструментов 20G [175, 176].

В нашей стране неоценимый вклад в развитие витрэктомии при ОЭ внесла Гундорова Р.А. с соавт. (1977), разработав методику измельчения и

активного механического удаления патологического субстрата из витреальной полости с помощью витреофагов, криоэкстракторов оригинальных конструкций [11].

Следующим направлением, которое существенно повлияло на прогресс в лечении ОЭ – это первые попытки использования АБ в офтальмологии. В начале 40-х Von Sallman L. с соавт. впервые выполнили попытку интравитреального введения Пенициллина мышам с индуцированным стафилококковым ОЭ, а в последующие годы занимались ИВВ АБ людям, не получив положительных функциональных результатов [246, 245]. К сожалению, спорные результаты первых попыток лечения ОЭ данным методом привели к тому, что исследования были заброшены почти на два десятилетия [185].

В 1960-х годах ситуацию усугубляли публикации о том, что успешное лечение ОЭ зависит от соответствующего использования химиотерапевтического агента и правильного выбора маршрута его введения, которые обеспечивают доступность лекарства и поддерживает необходимую концентрацию. С этого периода началась эра, когда более 50% ОЭ лечились системным применением Хлорамфеникола [111].

Параллельно, по мере накопления опыта использования АБ в клинической практике, нарастающей резистентности к Пеницилину, у офтальмологов росло понимание того факта, что необходимо найти такой химиотерапевтический агент, который обладал бы высокой эффективностью в отношении основных возбудителей ОЭ, минимальными токсическими свойствами на ткани глаза, к тому же отвечал требованиям по минимальному риску селекции резистентных штаммов микроорганизмов.

Здесь «на арену вышел» Ванкомицин. В 1952 году миссионер на Борнео отправил образец грязи своему другу доктору Э.К. Корнфилду, химику-органику из компании Eli Lilly. Организм, выделенный из этой пробы (*Streptomyces orientalis*), продуцировал вещество («соединение 05865»), которое было активно против большинства грамположительных организмов,

включая пенициллин-резистентные стафилококки [44]. После 20 последовательных пассажей стафилококков из лабораторий Eli Lilly резистентность к Пенициллину увеличилась в 100 000 раз, по сравнению только с 4-8-кратным увеличением резистентности к соединению 05865 [159].

Все эти события подтолкнули Голама Пеймана и его коллег в 70-80-х годах прошлого столетия провести титаническую работу, направленную на исследование фармакокинетики, фармакодинамики, оценку токсичности различных АБ на моделях индуцированного ОЭ у лабораторных животных, кроликов, человекообразных обезьян, что естественно сформировало основу для клинических испытаний на людях. Кроме того, были определены наиболее перспективные группы лекарственных препаратов, способных гарантированно покрывать весь спектр возможных возбудителей ОЭ [184, 187-189, 73, 46].

В нашей стране неоценимый вклад в исследования по доставке АБ к патологическому очагу, начиная от ИВВ АБ до внутриартериальной офтальмоперфузии, непрерывной перфузии стекловидного тела в сочетании с введением препаратов внутривенно, внутримышечно, пара- и ретробульбарно, супрахориоидально, в субтенозово пространство и эпibuльбарно, внесла Гундорова Роза Александровна с коллегами [11].

Как было описано ранее, на сегодняшний день современные подходы к комплексному лечению ОЭ отражены в исследованиях EVS 1995 и ESCRS 2013, и включают в себя «золотой стандарт»: проведение 3-портовой витрэктомии с посевом содержимого передней камеры и витреальной полости на микрофлору и ИВВ АБ на завершающем этапе операции в течение 1 часа после диагностирования ОЭ [52, 170].

Таким образом, на сегодняшний день последние достижения в области биохимии, микробиологии, фармацевтики и многих комплексных фундаментальных наук позволили человечеству очень далеко продвинуться в лечении инфекционных заболеваний, однако над нами нависла угроза, не менее опасная, способная вернуть человека в доантибиотическую эпоху, и имя

этой «болезни» – антибиотикорезистентность, которая сопровождает нас параллельно с внедрением фармакологических инноваций. К сожалению, как человечество борется за свое существование, так и другие формы жизни, опасные для нас, не лишены этой генетически заложенной необходимости.

Уже к 1950 году практически все достижения прошлого десятилетия стали под угрозой, в связи с нарастающим количеством сведений о возросшей резистентности к Пенициллину. Спустя несколько лет открытие и внедрение в клиническую практику бета-лактамов АБ стабилизировало ситуацию на некоторое время [220].

Однако в 1962 году в Соединенном королевстве и в 1968 году в США были выявлены и зарегистрированы первые случаи обнаружения метициллин-резистентного золотистого стафилококка (MRSA). Лучезарный дебют Вакомицина в начале 70-х пророчил гарантированное уничтожение MRSA и коагулазо-негативных стафилококков (CNS), без риска развития резистентности, однако первые случаи устойчивости к Ванкомицину были выявлены уже в 1979 и 1983 годах.

Фармацевтическая промышленность выводила на рынок десятки АБ в период с 1940-х до настоящего времени, тем не менее, бактерии демонстрировали и демонстрируют поразительное качество: в промежуток от 3 до 5 лет 10-15% штаммов приобретают абсолютную устойчивость к «атакующим» их фармакологическим агентам. Естественно, вопросы резистентности к АБ не обошли офтальмологию, тем более в вопросах лечения ОЭ. Периодически в научных изданиях фигурируют публикации, посвященные неудовлетворительным, а иногда и успешным функциональным и анатомическим результатам лечения пациентов с экзогенными и эндогенными ОЭ, обусловленными резистентной бактериальной флорой [106, 213, 167, 119, 200].

Если провести анализ причин развития антибиотикорезистентности, то можно выделить ряд основополагающих факторов внутреннего и внешнего характера.

К внутренним факторам можно отнести мобильные генетические элементы бактерий (плазмиды), выполняющие функцию горизонтального переноса генов, отвечающих за устойчивость к АБ и мутационные микроэволюционные изменения в гено типе бактериальной клетки, способные приводить к развитию неуправляемой полирезистентности [198].

Совокупность этих микро- и макроэволюционных изменений во внешних признаках возбудителя детерминирует систему факторов агрессии, инвазии, защиты и приспособления бактерии.

В свою очередь внешние факторы характеризуются невероятным разнообразием, так как руку к ним приложил сам человек.

Одним из самых существенных из них является чрезмерное злоупотребление АБ и их самоназначение. Еще А. Флеминг писал, что общественность потребует «золотую пулю» от бактерий и начнется эпоха злоупотребления [220, 198, 53]. Несмотря на все упреждающие факторы, число потребляемых АБ растет, что естественно ведет к экспоненциальному риску антибиотикорезистентности у чувствительных бактерий [171]. Более того, если системные АБ сегодня, как правило, можно приобрести только по рецепту, то в отношении офтальмологических антибактериальных капель ситуация противоположная.

Следующим фактором, который вытекает из предыдущего, является неправильное назначение АБ медицинскими работниками, в виде субклинических доз, чрезмерно коротких курсов лечения, а иногда назначение их при полном отсутствии показаний к антибиотикотерапии [242]. Для примера, Шведские отделения интенсивной терапии в ходе лабораторных исследований подтвердили, что от 30-60% назначаемых АБ были не нужны или были назначены неправильно [148].

В терапевтической офтальмологической практике, зачастую, антибиотики назначаются без должного надзора, например, в качестве средств профилактики, при вирусных поражениях глазной поверхности или вообще без проведения дифференциальной диагностики. В офтальмохирургии,

особенно в случаях длительной терапии (например, ингибиторами ангиогенеза), пациент вынужден постоянно использовать АБ в до-, интра- и послеоперационном периодах, с ежемесячно повторяющимися циклами. В случаях необходимости использования интравитреального введения АБ (эндофталмзит), препараты вводятся эмпирически, для гарантированного перекрытия всех возможных возбудителей инфекции. Естественно, совокупность этих факторов способна приводить к необратимым изменениям глазной микробиоты, а в некоторых случаях к селекции антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов [94, 163].

Завершающим отягощающим внешним фактором 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 [198, 161].

Подводя итог, можно было бы сделать вывод, что необходимо всего лишь синтезировать новые АБ (учитывая возможности современных технологий) и продолжить долгоиграющую борьбу между «добром и злом», однако есть одно «но». На сегодняшний день фармакологические компании не имеют коммерческой заинтересованности в разработке новых АБ, в силу колоссальных трудо- и финансовых затрат, низкой окупаемости и чрезвычайной сложности по преодолению государственных бюрократических ограничительных барьеров [198, 161].

Таким образом, «кризис антибиотиков» требует незамедлительного решения не только в офтальмологической практике, но и во всех сферах медицинской деятельности, т.к. вклад эффективного подавления «армии» патогенных микроорганизмов для здоровья и процветания человечества чрезвычайно сложно преувеличить.

Ряд превентивных мер, которые могли бы существенно повлиять на кризис АБ активно прорабатываются на государственном уровне и включают в себя программы по сокращению свободного оборота АБ, оптимизацию терапевтических режимов, улучшение диагностических мероприятий по верификации возбудителей, профилактику распространения инфекций, оптимизацию взаимодействия между фармакологическими компаниями и регистрационными организациями, стимуляцию инвестиций и частного-государственного партнерства и, конечно, международную инициативу в вопросах системного взаимодействия [220, 161, 191, 147].

Однако совокупность этих важнейших мер, не дает практикующему врачу «реального» ощущения защищенности и вооруженности в случаях возникновения инфекционных осложнений в рутинной клинической практике. Клинициста интересуют конкретные, эффективные, законодательно одобренные антиинфекционные агенты.

Повышение осведомленности и общемировая вовлеченность в проблему подтолкнули фармацевтические компании к преодолению кризиса в вопросах создания новых АБ. В период между 2000 и 2010 годами FDA (Food and Drug Administration) было разрешено для клинического использования пять новых АБ, затем темп ускорился, и уже за 2014-2015 годы было одобрено еще 5 новых препаратов. Список этих препаратов включает Тигециклин (Tygacil, Pfizer, 2005), Дорипинем (Doribax, Shionogi, 2007), Телаванцин (Vibativ, Theravance Biopharma, 2008), Цефтаролина фосамил (Teflaro, Cerexa, 2010), Тедизолид (Sivextro, Cubist Pharmaceuticals, 2014), Далбаванцин (Dalvance, Durata Therapeutics, 2014), Оритаванцин (Orbactiv, Medicines Company, 2014), Цефтолозан/тазобактам (Zerbaxa, Cubist Pharmaceuticals, 2014), Цефтазидим / авибактам (Avycaz, Cerexa Inc., 2015).

К сожалению, большинство этих АБ не имеют разрешительных документов для их широкого использования в клинической практике в отношении чувствительных микроорганизмов и в основном одобрены для применения при инфекциях кожи и мягких тканей, осложненных инфекциях

мочеполовых путей, лечения пневмонии и воспалительных заболеваний брюшной полости. Кроме того, эти препараты имеют чрезвычайно ограниченный опыт применения на территории РФ и к сожалению, не разрешены для использования в офтальмологии.

В итоге, текущая ситуация провоцирует практикующих офтальмологов исследовать перспективные пути решения глобального «кризиса» антибиотикорезистентности, с точки зрения поиска и активного внедрения эффективных средств лечения воспалительных заболеваний глаза и его придатков.

Как было описано выше, одним из самых перспективных направлений, активно набирающих обороты за последние десятилетия, является терапия воспалительных заболеваний с использованием квантовых точек (КТ). Междисциплинарный характер отрасли и необходимость фундаментальной проработки ответвлений, делают специфику восприятия данного направления чрезвычайно сложной для практикующих врачей, в соответствии с этими особенностями публикации в отечественной медицинской литературе и специализированных медицинских изданиях отсутствуют.

Квантовые точки представляют собой полупроводниковые нанокристаллы размером несколько нанометров (нм) с контролируемыми оптическими и электронными свойствами, за счет изменения их размера, морфологии и покрытия. Диаметр ядра, количество оболочек (одна, две, три) на поверхности КТ, характер пассивации (покрытие на границе раздела ядра и оболочки для устранения электронных ловушек, как правило, за счет материала с большей шириной энергии запрещенной зоны), функционализации (специфического покрытия для связывания с биологически активными молекулами, белками, пептидами, нуклеиновыми кислотами – так называемое биоконъюгирование), позволяют использовать их в различных областях науки и техники [42, 254, 255].

Если опустить все физико-химические и оптические преимущества многогранного разнообразия КТ и сконцентрироваться на области

противомикробного воздействия, то можно сказать, что путем изменения состава, формы и размера фотовозбужденного носителя заряда, в качестве которого выступает КТ, и модуляции положения зоны проводимости и валентной зоны, можно осуществить избирательное возмущение окислительно-восстановительного гомеостаза в клеточной среде (микробной клетке), тем самым создав субстрат для так называемой «световой терапии».

При этом существует два направления в борьбе с мультирезистентной микрофлорой, одно из которых – это использование КТ в чистом виде, путем фотовозбуждения с образованием активных форм кислорода, губительно действующих на возбудителя [70]. Второе – комбинация АБ и фотоактивированных КТ, для увеличения потенциала активности используемых химиотерапевтических агентов [71].

Для того чтобы описать механизм действия КТ, необходимо рассмотреть основные принципы генерации и повреждения тканей. Известно, что энергия образуется в клетках в процессе окисления определенных субстратов, прежде всего, в ходе окислительного фосфорилирования [6]. Универсальными окислителями в данном случае выступают активные формы кислорода (АФК) – с физико-химической точки зрения это прежде всего свободные радикалы, имеющие неспаренный электрон на внешней электронной оболочке. При этом 95-98% вдыхаемого кислорода расходуется на выработку энергии и окислительный метаболизм субстратов, а 2-5% переходит в АФК [63].

Важнейшими АФК считаются супероксидный радикал $^{\bullet}\text{O}_2^-$, синглетный кислород $^1\text{O}_2$, гидроксильный $^{\bullet}\text{OH}$ и пероксидный $\text{HO}_2^{\bullet}$ радикалы, перекись водорода H_2O_2 , пероксидный ион HO_2^- и гипохлорит HOCl . При этом основные механизмы генерации АФК связаны с нарушениями электронно-транспортных цепей митохондрий или микросом, а также с нарушениями свойств дегидрогеназ [72, 206].

Одна из возложенных природой задач на АФК – это выступление в живых системах в качестве универсальных «киллеров». Например, главным источником АФК в организме человека служат клетки-фагоциты:

гранулоциты, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы [132], основную функцию которых мы прекрасно знаем.

Именно в этом формате – нарушителя электронно-транспортной цепи бактериальной клетки – выступают фотосенсибилизированные КТ.

Таким образом, механизм действия КТ выглядит следующим образом: фотосенсибилизированная (чрезвычайно реакционно активная) источником света определенной длины волны КТ имеет на своей поверхности не спаренные электроны, которые выступают в качестве донора для молекулярного кислорода, трансформируя его в супероксидный радикал, который в свою очередь обладает высокоспецифичным узконаправленным действием на бактериальные внутриклеточные кластеры железа и серы, разрушая нормальную внутриклеточную окислительно-восстановительную среду, необходимую для нормального функционирования патогенного микроорганизма [110].

Более того, коллоидный раствор КТ в сочетании с раствором АБ обладает эффектом потенцирования, повышая эффективность исследуемых АБ в сотни раз [71, 70, 92].

Учитывая эти факты, изучение возможности применения КТ в офтальмологии необходимо рассматривать как одно из чрезвычайно перспективных направлений в борьбе с инфекционными заболеваниями глаза.

Завершая вышеописанное, можно сделать следующие выводы: масштаб проблемы нарастающего кризиса антибиотикорезистентности огромен, и затрагивает каждого человека лично, который обращался, обращается и будет обращаться за любым видом медицинской помощи. На сегодняшний день совокупное влияние внешних и внутренних факторов не позволяет решить данную проблему без привлечения передовых технологий и междисциплинарных отраслей знаний. Перспективные направления развития науки и техники создают благоприятное впечатление о возможности смещения «чаши весов» в сторону победы человека над болезнетворными

микроорганизмами. Если, конечно, это не породит череду новых проблем человечества, но это уже совсем другая история.

Расширенные перспективы и области использования искусственных флуорофоров, в частности КТ, подробно изложены в следующем разделе диссертационного исследования.

1.4. Области применения наночастиц (квантовых точек) в офтальмологии, их структурная и динамическая организация

В последние годы активно исследуется возможность потенциального применения искусственных флуорофоров, в частности КТ, в различных областях науки и техники. Медицинская отрасль знания, и офтальмология в том числе, не является исключением.

В случаях использования неорганических нанометровых объектов (1-100 нм), способных вести себя в физической среде как самостоятельные функциональные единицы, сопоставимые по размерам с внутриклеточными структурами, оказывающими диагностические и терапевтические эффекты на макроорганизм, принято говорить о «наномедицине» [263].

Квантовые точки как потенциальные представители «наномедицины» представляют собой наноразмерные (2-10 нм) кристаллы сферической или эллиптической формы, в виде наностержней и нанооболочек, а также в виде структур типа «нанориса», «нанозвезд» или «наноклеток» [35]. Пространственное ограничение движения носителей заряда в КТ приводит к квантово-размерному эффекту, выражающемуся в дискретной структуре электронных уровней.

Полупроводниковые КТ обычно синтезируют из элементов групп II-VI или III-V периодической таблицы, например, селенида кадмия, теллурида кадмия, арсенида индия (CdSe, CdTe, InAs соответственно). Для повышения эффективности флуоресценции применяют структуру типа ядро/оболочка. Оболочка выполняется из другого полупроводника, например, сульфида

кадмия или цинка (CdS, ZnS), и имеет более широкую запрещенную зону. Введение оболочки (силанизация) значительно улучшает флуоресцентные свойства КТ и химическую устойчивость, обеспечивает возможность функционализации поверхности КТ для обеспечения коллоидной стабильности и биосовместимости, снижает токсичность КТ. Функционализация КТ определяет их биосовместимость и проводится, как правило, тиолированными молекулами полиэтиленгликоля, полиэтиленамином, олигонуклеотидами, иммуноглобулинами, пептидами, полисахаридами, липидами и т.д.

При попадании на КТ фотонов света в них может возникать плазмонный резонанс (ПР) за счет возбуждения на границе раздела сред локализованных поверхностных плазмон-поляритонов, возникновение которых связано с взаимодействием электромагнитного поля с плазмой свободных электронов в металле (полупроводнике) наночастицы. Как правило, КТ покрывают полимерной оболочкой, которая может усиливать плазмонный резонанс. Оболочек может быть несколько, вследствие чего появляется несколько границ раздела сред, усиливающих плазмонный резонанс.

Особенности физической морфологии КТ (размер, состав, поверхностная модификация, концентрация, длины волн возбуждения и эмиссии) определяют их универсальные оптические и оптоэлектронные свойства, которые дифференцируют их потенциальное применение в офтальмологической практике.

Особенности размера и силанизации квантовых точек

Девиация оптических и электронных свойств КТ напрямую зависит от их размера. Это свойство описывается термином «Стоксов сдвиг», который представляет собой разницу длин волн максимумов спектров поглощения и флуоресценции КТ. Это значит, что, когда КТ поглощает энергию, она переходит в возбужденное состояние, при этом существует несколько возможностей для её возврата в основное состояние. Одним из них и является флуоресценция. Вследствие разных физических причин часть поглощенной

энергии теряется в безызлучательных процессах, в результате чего испущенный фотон имеет меньшую энергию, и, следовательно, большую длину волны, чем поглощенный.

Именно это явление используется в офтальмовизуализации, т.к. изменение размера КТ, соответственно, можно свести к флуоресценции в удобном для исследователя видимом или ближнем инфракрасном диапазонах. Ряд исследований, проведенных для визуализации клеток роговицы и сетчатки, показали свое преимущество над существующими аналогами [88, 80, 51, 195].

Размер КТ может иметь существенное значение, особенно в офтальмологической практике. Чем меньший диаметр КТ используется, тем более высокой проникающей способностью в ткани глаза они обладают, например, 20 нм КТ с легкостью проникают через гематоэнцефалический барьер после внутривенного введения и обнаруживаются в хориоиде и тканях сетчатки. Это явление обусловлено мгновенным прохождением КТ через межклеточные контакты, а также легкостью поглощения посредством фагоцитоза [130, 146, 104]. Опыт применения КТ сверхмалых размеров (3,28 нм) ограничен. Наибольший диаметр используемых КТ не превышал 25 нм [80, 125].

Существующая проблема фотодеградация КТ при воздействии на них источников возбуждения разных длин волн решается посредством использования различных оболочек. Известно, что оболочка из ZnS в составе КТ позволяет минимизировать риск токсического воздействия ядра КТ (например, состоящего из Cd), а также положительно влияет на прохождение биологических барьеров (в т.ч. гематоретинального), максимально увеличивая инертность КТ и минимизируя воздействие на окружающие ткани [101, 120].

Функционализация и конъюгация квантовых точек

Вопросы функционализации (модификации) КТ представляют особый интерес в силу того, что именно функционализация определяет потенциальную область их использования. В качестве общих биологических

требований (инертность и/или необходимость биологического взаимодействия) определяется присоединением классических функциональных групп, таких как полиэтиленгликоль, карбоксильная – COOH, или аминогруппа – NH₂. Дополнительно модифицировать поверхность КТ можно посредством присоединения (конъюгации) генов, стволовых клеток, антагонистов рецепторов, биологических активных веществ, химических соединений и др. Получение таких модификаций КТ позволяет использовать их в прижизненной офтальмовизуализации интраокулярных структур (пути оттока внутриглазной жидкости, хориоидальной неоваскуляризации и др.) и, например, для лечения инфекционных заболеваний с таргетной доставкой лекарственных препаратов [114, 108, 96, 180, 253, 97, 248].

Концентрация/доза квантовых точек

Вопросы объема и концентрации КТ, вводимых в интраокулярные структуры, остается открытым в силу недостаточности данных в отношении полного комплекса терапевтических и токсических эффектов. Работы по местному использованию КТ в офтальмологии, а также в виде интравитреальных и внутривенных инъекций [130] появились достаточно давно и демонстрируют благоприятную общую и местную переносимость.

Работы по применению КТ в качестве средств для местной визуализации изменений слезной пленки описывают дозы в 0,5-1,0 мкл [125].

В среднем, 10 мкл КТ применялось для визуализации оттока внутриглазной жидкости из передней камеры [123]. Около 200 мкл КТ было использовано для визуализации структур стекловидного тела [261].

Первый опыт безопасного использования КТ в качестве средства лечения пигментного ретинита описывает дозу в 0,2 мкл с положительным клиническим эффектом и отсутствием офтальмологических осложнений [113]

.

Длины волн возбуждения квантовых точек

С точки зрения интенсивности свечения лучшие КТ – это имеющие наибольший квантовый выход и время флуоресценции. Преимущество КТ над другими флуорофорами состоит в их уникальных оптических свойствах: высокой фотостабильности и квантовом выходе, широком спектре частот поглощения, возможности перестройки узкого спектра частот эмиссии, чистоте возможных цветов свечения. Это позволяет проводить, например, сверхчувствительное детектирование, достигающее уровня единичных молекул. Органические красители, в свою очередь, обладают рядом недостатков: менее стабильная флуоресценция, отсутствие возможности перестройки спектров эмиссии, невысокая проникающая способность в ткани глаза [266, 143, 250, 162, 228].

Применение квантовых точек в качестве биологических маркеров

Исследования, посвященные улучшению свойств визуализации посредством применения КТ, активно проводятся на лабораторных животных. Ярмолинской М.И. (2012) предпринята попытка визуализации кровеносных сосудов, рецепторов антигенов и лимфатических узлов в одной тканевой популяции [43]. Активные исследования проводились в области обнаружения отдельных молекул, например, определения уровня иммуноглобулина G в сетчатке крысы, а также в области субпопуляций эндотелиальных клеток предшественников при лазер-индуцированной субретинальной неоваскулярной мембране [51]. Существуют работы по изучению транскрипционных пептидов, участвующих в функционировании лимбальных эпителиальных клеток человека и их выживаемости [88]. Вопросы визуализации нейронов сетчатки и ее нейроархитектоники аналогичным образом решались Adijanto J. с соавт. (2009) посредством использования КТ [41].

Отдельного внимания заслуживают работы по визуализации лазер-индуцированного глиоза и витреоретинальной пролиферации у лабораторных животных с помощью КТ [180]. Они также изучались активно для раннего

обнаружения субретинальной неоваскуляризации, в случаях отрицательных флуоресцеиновых проб у подопытных животных [228].

Активно применялись КТ и в диагностике заболеваний роговицы и витреальной полости. Исследования по дифференцировке поврежденных эпителиоцитов у крыс продемонстрировали высочайшее качество визуализации, а также при раннем выявлении заболеваний центральных отделов сетчатки [108, 251, 177].

Имеются работы по конъюгированию КТ с блокаторами рецептора ангиотензина-2 в эндотелии сосудов после внутривенной доставки, для снижения скорости прогрессирования диабетической ретинопатии у лабораторных животных, показавшие впечатляющие результаты *in vitro* и *in vivo* [104].

Аналогичным образом используются КТ в качестве конъюгатов с мусцимолом (блокатор гамма-аминомасляной кислоты) для воздействия на передачу нервного импульса в сетчатке в эксперименте. Работа демонстрирует возможность таргетной доставки лекарственных веществ непосредственно к нейроретине [96, 97].

Применение квантовых точек в качестве средств визуализации

Известно, что оптическая система изобильна оптически прозрачными структурами – слезная пленка, роговица, стекловидное тело. Исследования по визуализации стекловидного тела на свиных глазах посредством оптической стимуляции КТ стандартными осветителями продемонстрировали превосходные анатомические результаты [261].

Водный и липидный слои слезной пленки также активно исследовались посредством КТ [125].

Одним из существенных преимуществ КТ является возможность их возбуждения посредством стандартных офтальмологических осветителей.

Активное использование КТ в диагностике позволило провести исследование путей оттока внутриглазной жидкости у мышей посредством функционализации КТ латанопростом. Это также дает возможность отследить

пути эвакуации лекарственного препарата из структур глаза (трабекулярный и увеосклеральный пути) [230].

Имеется ряд исследований по изучению дренажной анатомии лабораторных животных и людей с применением КТ. Более того, есть данные об отсутствии гистоморфологических изменений, вызванных прохождением КТ через структуры оттока внутриглазной жидкости [20, 23].

Применение квантовых точек в качестве антиинфекционных агентов

Инфекционные заболевания, вызываемые такими микроорганизмами, как бактерии, грибы, вирусы или паразиты, являются основной причиной смерти во всем мире. Более того, микроорганизмы с множественной лекарственной устойчивостью представляют особую угрозу в силу того, что современные антиинфекционные агенты не имеют механизмов их эрадикации.

Наряду со стандартными методами борьбы с бактериями и вирусами на первый план выдвинулись и фотодинамические методы, хорошо зарекомендовавшие себя в лечении заболеваний кожи, эстетической медицине, лечении герпеса, рака кожи головы, шеи и др. Фотодинамическая терапия основана на использовании наночастиц (НЧ) и КТ как фотосенсибилизаторов с выделением активных форм кислорода при антимикробном воздействии на пораженные клетки.

Здесь особо важную роль играет вышеописанный выбор НЧ/КТ в части размеров, формы, функционализации, обеспечивающих их биосовместимость, нетоксичность, гидрофильность, химическую и физическую стабильность, высокий квантовый выход на основе Ферстеровского переноса энергии (FRET-механизма) в качестве доноров. Антивирусная и антибактериальная активность НЧ/КТ зависит от многих параметров, включая оптические свойства, характеристики фотовозбужденного состояния и поверхностные функции НЧ/КТ.

С физической точки зрения фундаментальные процессы взаимодействия полупроводниковых КТ и белков основан на электронно-дырочном замещении при переходе электронов в более высокое возбужденное

энергетическое состояние и обратно (эффект «дефектной вакантной рекомбинации»), сопровождающееся изменением связей от валентных к проводимости и обратно при эмиссии излучения.

В ряде работ описывается взаимодействие КТ с вирусами типа SARS-CoV-2, MERS-CoV, SARS-CoV1 в ультрафиолетовом, видимом и инфракрасном участках спектра. КТ взаимодействуют с вирусами за счет сил Ван-дер-Ваальса, определяющих тепловые, электродинамические флуктуации, флуктуации физико-химических характеристик окружающей среды, влияющих на силы дисперсии. Флуоресцентный наносенсор, образованный «сэндвич-структурой» из квантовых точек CdTe и ДНК, продемонстрировал эффективное обнаружение специфической целевой комплементарной ДНК или РНК вируса SARS CoV-2 с использованием FRET-эффекта [124, 45, 156, 264, 50].

В более ранних работах исследовались свойства КТ, функционализированных спермидином, с выявлением высокой антиинфекционной активности *in vitro* в отношении *Escherichia coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *Salmonella enterica* в моделях инфекционного кератита, в сравнении с чистым спермидином. Более того, признаки токсического повреждения структур глаза не были выявлены [114, 253].

Результаты исследований показывают, что основные процессы, ответственные за противомикробные эффекты НЧ/КТ, связаны с генерацией АФК. Механизм воздействия на бактерии включает адгезию КТ к бактериальной поверхности, фотоиндуцированную выработку АФК, разрушение и проникновение КТ через бактериальную клеточную стенку/мембрану, индукцию окислительного стресса с повреждениями ДНК/РНК, что приводит к изменениям или ингибированию экспрессии важных генов и индукции окислительных повреждений белков и других внутриклеточных биомолекул. При освещении видимым/естественным светом КТ, контактирующие с бактериальной клеткой, могут эффективно генерировать АФК, активируя кислород в воздухе или воде. Это приводит к

образованию гидроксильных свободных радикалов и/или синглетного кислорода, которые могут разрушать некоторые из критических биомолекул в клетке и приводить к гибели клеток. Активные формы кислорода вызывают инактивацию внутриклеточного белка, перекисное окисление липидов, дисфункцию митохондрий и постепенный распад клеточной мембраны с последующим некрозом/апоптозом и возможной гибелью клеток [77, 40, 87].

Работы по исследованию антиинфекционных свойств КТ, а также потенциала их применения в офтальмологической практике активно ведутся в нашей стране, полученные результаты демонстрируют широкий спектр их антиинфекционной активности, безопасность использования, а также высокий потенциал в лечении бактериальных кератитов и эндофтальмитов, вызванных G^- и G^+ микрофлорой.

Ряд работ, посвященных применению КТ в области лечения дрожжевых и плесневых микозов, демонстрирует перспективность развития данного направления в офтальмологии. Chand P. с соавт. (2021) показали, что КТ типа ZnO в диапазоне от 0 до 200 мкг/мл подавляли рост практически 90% *Candida*, в сочетании с азоловыми и полиеновыми антимикотиками. При этом добавление КТ значительно снижало необходимую дозу последних [62].

Применение квантовых точек в доставке лекарственных препаратов

Выше было описано, что КТ обладают способностью проникать через различные барьеры, в силу их миниатюрности. Данные свойства могут оказать существенное влияние на повышение эффективности таргетной терапии. Например, исследования по доставке золотых и кадмиевых НЧ к сетчатке, хориоиде посредством внутривенного введения, продемонстрировали свою безопасность, ареактивность и хорошую переносимость, более того, были проанализированы пути их эвакуации и выявлен преимущественный трансрентальный (почечный) путь [104, 130].

Аналогичным образом разрабатываются предпосылки для применения НЧ в области доставки лекарств к конкретным структурам глаза, например, к трабекулярной сети для последующего лечения глаукомы [248].

Применение квантовых точек в качестве электрических стимуляторов сетчатки

Известно, что нейродегенеративные и наследственные заболевания сетчатки приводят к развитию необратимой слепоты и слабовидения. Исследования, проведенные на моделях лабораторных животных, в ходе которых в витреальную полость вводились различные типы НЧ, продемонстрировали увеличение выживаемости клеток сетчатки, улучшение когнитивных и ориентационных характеристик подопытных животных, а также показали улучшение электрической активности сетчатки, в сочетании с отсутствием нежелательных токсических реакций [177, 131].

На сегодняшний день есть клинический опыт интравитреального введения НЧ людям для стимуляции нейроэлектрической функции сетчатки при пигментном ретините [113].

Таким образом, на сегодняшний день наночастицы, в частности КТ различных параметров и физико-химических характеристик, все прочнее закрепляются в различных областях науки и техники, в том числе в офтальмологии. Уникальные физические, химические и биологические свойства КТ позволяют активно проводить исследования на лабораторных животных и в некоторых случаях на добровольцах. Области потенциального применения КТ в офтальмологии достаточно широки и ориентированы на визуализацию, доставку лекарственных препаратов, электрическую стимуляцию и антиинфекционную активность широкого спектра.

Ограничения, существующие на сегодняшний день, связаны с фундаментальными исследованиями в области острой и хронической цитотоксичности, подборе безопасных доз и концентраций КТ, отработке механизмов их доставки, а также в исследовании механизмов химико-биологического взаимодействия со структурами зрительного анализатора при динамически изменяемых физических параметрах КТ (форма, размер, особенности функционализации и силанизации).

Междисциплинарные взаимодействия столпов фундаментальной медицины, в частности офтальмологии, а также физики, биологии, химии, вероятно, позволят в ближайшее пятилетие реализовать в клинической практике все фундаментальные принципы, заложенные в предыдущих исследованиях.

Научные данные, полученные автором диссертационного исследования в ходе написания обзора литературы, актуализируют основную цель работы, направленную на поиск, исследование и реализацию методов борьбы с резистентными бактериальными заболеваниями глаза для сохранения здоровья и благополучия населения.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ КЛИНИКО- ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫХ, ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ И ФАРМАКОЭКОНОМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Дизайн исследования

Дизайн диссертационного исследования включает в себя совокупность клинико-инструментальных, фундаментальных, экспериментальных и фармакоэкономических исследований, направленных на разработку и клинико-экономическое обоснование внедрения технологии лечения лекарственно резистентных бактериальных инфекций глаза с помощью конъюгатов на основе наночастиц (квантовых точек) в систему здравоохранения.

Для подтверждения данных об актуальности темы диссертационного исследования необходимо было провести ретроспективный анализ результатов лечения бактериальных инфекций глаза, в основе которого лежит работа с медицинской документацией с последующей ее статистической обработкой.

Фундаментальная часть работы основана на проведении физико-химических, биологических и фармакологических исследований с задействованием медицинского и специализированного оборудования, в задачи которого входит обоснование возможности использования квантовых точек и конъюгатов на их основе в лечении антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза.

Экспериментальная часть диссертации заключалась в проведении лабораторных методов исследования, в частности метода диско-диффузионного анализа, в аспекте доказательства антибактериальной активности квантовых точек и конъюгатов на их основе, а также экспериментов с участием лабораторных животных для моделирования

воспалительного процесса на переднем и заднем отрезках глазного яблока с последующей оценкой эффективности разработанной технологии лечения антибиотикорезистентной бактериальной инфекции глаза.

В случае доказательства лабораторной и экспериментальной эффективности разработанной технологии, необходимо проведение исследований, направленных на изучение безопасности на клеточном, тканевом, функциональном и анатомическом уровнях с непосредственным участием лабораторных животных и использованием клеточных технологий.

Диссертационное исследование завершается разработкой требований для создания лекарственного препарата, проведением фармако-экономического анализа, а также определением места разработанной технологии в системе фармакотерапии антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза.

Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, обработаны с помощью статистических и математических методов.

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



Рисунок 1 – Дизайн диссертационного исследования

2.2. 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», далее Центр. 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. Ключевой вопрос, который стоял перед исследователем в данном разделе исследования, – существует ли необходимость разработки новой технологии лечения, или функциональные и анатомические результаты существующих терапевтических подходов удовлетворяют клиницистов в указанном аспекте.

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.

2.3. Фундаментальные исследования

Данные этапы работы должны были ответить на вопрос исследователю – возможно ли потенциальное использование квантовых точек (КТ) в офтальмологии на основании изучения их фундаментальных свойств?

Для ответа на этот вопрос было необходимо провести несколько этапов экспериментальных исследований.

Этап 1. Разработка и синтез квантовых точек для офтальмологического применения

В основе технического задания для разработки и синтеза КТ, предназначенных для потенциального офтальмологического использования, – предполагаемая автором совокупность физических, химических спектральных и фармакологических характеристик, максимально подходящих к физиологическим параметрам глазного яблока.

Синтез КТ по техзаданию был выполнен в Научно-исследовательском институте «Прикладной акустики» (научно-производственная база производства широкого диапазона КТ), г. Дубна, Московская область. Техническое задание было сформировано на основании следующих заявленных характеристик:

- синтезируемые КТ могут содержать в своем составе металлы, обладающие потенциальными антиинфекционными свойствами (например, 1% серебро), что было доказано в результате рандомизированных исследований [164];

- предельный диаметр КТ не должен превышать 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 не должны присутствовать незащищенные полупроводники, обладающие возможными токсическими свойствами во время полураспада молекулы, перечень которых изложен в [168];

- в качестве растворителя массы вещества КТ должна использоваться вода, для потенциальной возможности эпibuльбарного и интравитреального использования;

- квантовый выход флуоресценции не должен превышать 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 должен быть широким, для обеспечения возбуждения в широком диапазоне частот, в том числе в видимой области спектра;

- спектр эмиссии КТ должен лежать в узком диапазоне, для минимизации риска токсического повреждения интраокулярных структур;
- функционализация КТ возможна химически активными карбоксильными или аминными группами для увеличения их реакционной способности;
- основной параметр заключался в возможности всех типов синтезируемых КТ к выработке АФК в заданных параметрах.

Все возможные вариации КТ, подходящие по запрашиваемым параметрам, синтезировались восходящим химическим методом (Рисунок 2).

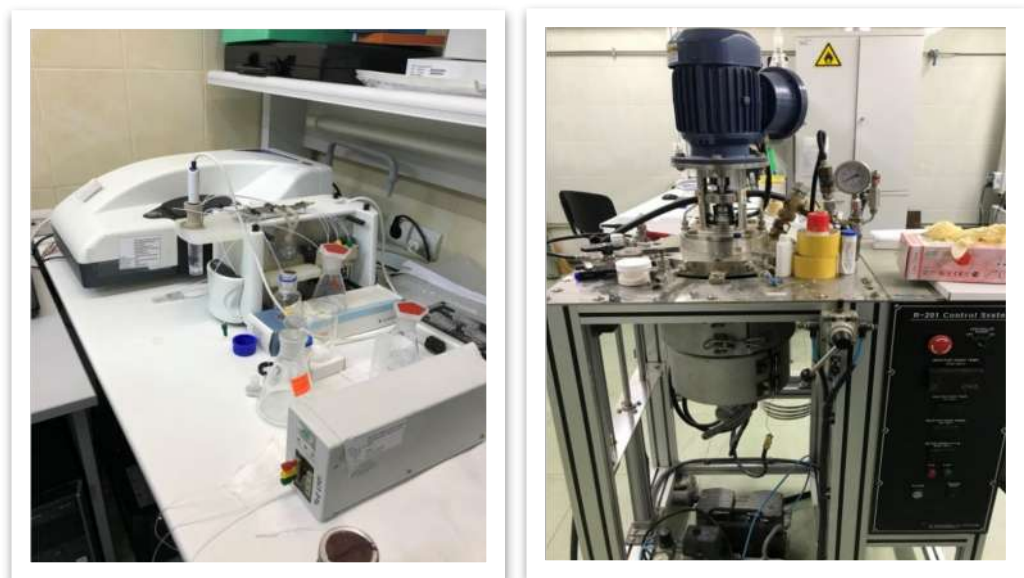


Рисунок 2 – Установка для промышленного и локального синтеза КТ, НИИ «Прикладной акустики», г. Дубна (*публикуется с разрешения руководителя лаборатории)

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 на спектрофотометре UV-Vis-NIR Cary 5000 (Varian, Австралия) (с шагом 1 нм).

Спектры фотолюминесценции измеряли на спектрофлуориметре HORIBA Fluorolog-3 (Scientific, США).

Синтез проводили в соответствии с методикой, описанной в [116]. Солюбилизацию в водную фазу проводили с использованием 3-меркаптопропионовой кислоты. Модификацию и очистку образцов проводили по методике [196]. Полученные растворы экспортировались стерильными в АО «Екатеринбургский Центр МНТК «Микрохирургия глаза».

Учитывая ключевое исследуемое свойство КТ, которое определяется способностью к генерации АФК в лечении инфекционных заболеваний глаза, требовалась разработка оригинальной методики по идентификации образования АФК квантовыми точками, а также исследование скорости их генерации в видимом диапазоне в зависимости от изменений pH среды (pH среды в свою очередь является основным, динамически меняющимся показателем в условиях изменения гомеостаза организма, например, под действием инфекционного процесса).

Этап 2. Разработка методики детектирования активных форм кислорода и скорости их образования при облучении КТ светом в видимом диапазоне длин волн и при изменении pH среды

В данной части диссертационного исследования было предложено создание простой методики сравнения КТ по скорости генерации АФК. В качестве маркера формирования супероксидного радикала, обладающего восстановительными свойствами, был исследован цитохром С (CytC). Простота его использования и спектрометрический метод детекции восстановленной формы CytC был описан ранее в [260]. Поскольку ряд АФК обладают и окислительными свойствами (гидроксильный радикал, синглетный кислород и др.), в дополнение к данному методу была исследована реакция окисления дигидрородамина (ДГРМ), также легко детектируемого спектрометрией [183].

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*3 Вт 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 по методике [60].

После завершения синтеза различных типов КТ, предназначенных для офтальмологического использования, а также доказательства их способности к генерации АФК, было необходимо исследовать особенности их физического взаимодействия непосредственно с бактериальной клеткой, чему посвящён следующий этап фундаментальных исследований.

Этап 3. Исследование физического взаимодействия и фармакокинетики КТ с бактериальной клеткой методами сканирующей/растровой и просвечивающей электронной микроскопии

Исследования по электронной микроскопии 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% (разведение для наилучшей

визуализации было получено путем титрования водного раствора) 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. Культуру МРЗС исследовали 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 растровой электронной микроскопии (РЭМ) использовали электронный микроскоп Sigma VP (Carl Zeiss, Германия) в режиме высокого вакуума. Исследуемые образцы наносили на углеродную ленту перед помещением в камеру микроскопа (Рисунок 3).



Рисунок 3 – Растровый электронный микроскоп Sigma VP научно-образовательного центра «Наноматериалы и нанотехнологии» УрФУ, г. Екатеринбург

Для выполнения просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) использовали микроскоп JEM-2100 (Япония). Во всех случаях перед исследованиями на образцы наносили аморфную углеродную пленку. Образцы закрепляли на держателях и помещали в камеру электронного микроскопа (Рисунок 4).



Рисунок 4 – ПЭМ JEM-2100 (Япония) в лаборатории электронной микроскопии сверхвысокого разрешения УрФУ, г. Екатеринбург

После изучения кинетики взаимодействия КТ непосредственно с бактериальной клеткой, в задачи диссертационной работы входило создание конъюгатов на основе КТ и современных АБ, применяющихся для лечения глазных инфекционных заболеваний. На старте фундаментальных исследований проанализированы результаты зарубежных исследований, посвященных многократному увеличению антиинфекционной активности современных АБ за счет двунаправленного механизма действия: первый из которых связан со стандартным механизмом действия АБ (зависит от группы лекарственного вещества), а второй – с процессом образования АФК и разрушения бактериальной клетки посредством КТ. Вышеописанные аддитивные эффекты могут потенциально использоваться в минимизации риска селекции резистентных штаммов микроорганизмов за счет внедрения в процесс дополнительной антиинфекционной активности в виде КТ. Данная совокупность предположений также должна минимизировать дозу и кратность применения АБ, а также значительно сократить затраты на лечение с сокращением сроков реабилитации пациентов.

Этап 4. Синтез и исследование конъюгатов на основе КТ и АБ, используемых в офтальмологической практике, на основании оптического поглощения и фотолюминесценции

Исходя из вышеописанных данных, в качестве современных средств лечения инфекционных поражений заднего отрезка глаза были взяты стандартные препараты, используемые для лечения инфекционного эндофтальмита – Ванкомицин 1000 мг и Цефтазидим 1000 мг, которые представляют собой АБ, перекрывающие весь спектр возможных возбудителей бактериальной инфекции, вызванной G^+ и G^- микрофлорой, с путем доставки к интраокулярным структурам посредством интравитреальной инъекции.

В качестве современных препаратов для создания конъюгатов, эффективных в отношении G^+ микрофлоры, был взят раствор Левофлоксацина для эпibuльбарного использования, в качестве АБ с превалирующей активностью в отношении G^- микрофлоры – раствор Тобрамицина для эпibuльбарного применения.

В качестве КТ использовали молекулы $InP/ZnSe/ZnS$ и $CdTe/Cd$ как наиболее реакционногенные субстанции, исходя из данных, полученных в результате возможности образования АФК. Квантовые точки типа $Ag(10\%):InP/ZnS$ были исключены из аналитического этапа в силу абсолютной схожести химической структуры с КТ типа $InP/ZnSe/ZnS$.

Следующий этап фундаментального исследования заключался в изучении возможности химического и физического взаимодействия между субстратами, в частности, между КТ и подобранными АБ. Учитывая возможность идентификации обоих субстратов и оценки влияния друг на друга с помощью оптических методов, эталонными являются оптическое поглощение и фотолюминесценция.

Аттестацию абсорбционных и фотолюминесцентных характеристик КТ в различных концентрациях, конъюгатов на основе КТ и АБ стандартно

выполняли на приборной базе Университетского научно-образовательного центра «Наноматериалы и нанотехнологии» (НОЦ НАНОТЕХ) УрФУ.

Спектры оптического поглощения образцов регистрировали на спектрофотометре UV-2450 (Shimadzu, Япония) при комнатной температуре. Исследуемые образцы помещали в кварцевую кювету с длиной оптического пути 1 см. Шаг сканирования составлял 0,5 нм.

Спектры фотolumинесценции регистрировали на флуоресцентном спектрометре Perkin Elmer LS55 (Analitical Science, США) при комнатной температуре. Исследуемые образцы помещали в кварцевый капилляр с внутренним диаметром 1 мм. Скорость сканирования составляла 120 нм/мин, спектральная ширина щелей возбуждающего и регистрирующего монохроматоров – 10 нм.

Далее было изучено влияние температурных характеристик на активность КТ. Например, температура роговицы при открытой глазной щели варьирует от 23 до 27 градусов, при закрытой – стремится к физиологической (36,6 градусов). В свою очередь температура витреальной полости может в значительной степени варьировать в зависимости от наличия патологического процесса в задней камере и подниматься в соответствии с общесоматическими подъёмами температуры во время воспаления в организме (до 39-41 градусов). На основании этого, чрезвычайно важно понимать динамическую организацию КТ в условиях изменения температурного режима.

Этап 5. Исследование влияния температурных изменений на клиническую активность КТ

В качестве объекта исследования брались КТ типа InP/ZnSe/ZnS 650 (n=20). Температурные особенности фотolumинесценции исследовали в НОЦ «Наноматериалы и нанотехнологии» УрФУ (г. Екатеринбург) на флуоресцентном спектрометре Perkin Elmer LS55 (Analitical Science, США) с оригинальным компактным нагревателем.

Спектры возбуждения и свечения измеряли со скоростью сканирования 60 нм/мин при ширине щелей возбуждающего и регистрирующего монохроматоров 5 нм. Температура образцов варьировала в диапазоне от 22 до 50 С. Образец готовили следующим образом: каплю коллоидного раствора КТ InP/ZnSe/ZnS 650 в физиологическом растворе концентрации 17 мг/мл наносили на серебряную подложку, выдерживали в течение 1 часа до полного высыхания при комнатной температуре.

В свою очередь, интравитреальное введение конъюгата на основе КТ с целью лечения воспалительной патологии заднего отрезка глазного яблока может сопровождаться активным физико-химическим взаимодействием с биологическими субстратами, находящимися в витреальной полости во время воспалительного процесса (например, антитела, иммунокомпетентные клетки, химические соединения, применяемые во время операционной деятельности). Данные объекты теоретически способны повлиять на оптические и люминесцентные свойства КТ и, как следствие, оказывать непосредственное влияние на способность к выработке АФК. В этой связи было необходимо исследовать возможность влияния биологического окружения на физико-химическую активность КТ, чему и посвящен следующий этап фундаментальных исследований.

Этап 6. Исследование влияние 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 1 представляли собой 0,01% коллоидные растворы КТ InP/ZnSe/ZnS 650 в физиологическом растворе в объеме 0,5 мл, образцы 2 – коллоидные растворы вышеописанных КТ с антителами к вирусу гриппа H1N1 в соответствующих объемных отношениях. Образцы наливали в кварцевую пробирку с внешним диаметром 4 мм и внутренним диаметром 2,5 мм. В качестве растворителя использовали физиологический раствор.

Температурные особенности фотолюминесценции стандартно исследовали на флуоресцентном спектрометре Perkin Elmer LS55. Спектры фотолюминесценции измеряли со скоростью сканирования 120 нм/мин при ширине щелей возбуждающего и регистрирующего монохроматоров 5 нм (образец 1) и 10 нм (образец 2). Все измерения проводили при комнатной температуре.

Учитывая потенциальную возможность применения КТ и конъюгатов на их основе в качестве лекарственных средств с различными путями доставки – интравитреальная инъекция, инстилляция в виде капель, вопросы, связанные с возможностью стерилизации растворов без потери химической и физической активности КТ, приобретают особую актуальность. Исходя из вышеописанных данных, существуют различные способы стерилизации КТ, однако одним из самых перспективных, легко выполнимых и доступных коммерчески является стерилизация с помощью трековых мембран, характеризующихся гидрофобно-гидрофильным балансом, смачиваемостью и адсорбционными свойствами.

Известны преимущества трековых мембран для нано- и ультрафильтрации [3, 7], а их привлекательность связана с возможностью управления избирательностью травления треков и геометрией нанопор при формировании каналов в полимерной матрице.

На первой стадии получения трековых (ядерных) мембран треки формируются с использованием ускорителей тяжелых ионов. Проходя через вещество, тяжелый ион взаимодействует с электронами матрицы. Часть атомов матрицы на пути тяжелого иона переходит в возбужденное состояние, часть ионизируется. Зона, в которой концентрация возбужденных и ионизированных атомов высока, имеет диаметр порядка 10 нм и образует сердцевину трека. Процессами, обуславливающими разрушение структуры исходного материала в сердцевине, считают кулоновский взрыв и термический пик. Сформированные треки облегчают процесс химической деструкции находящихся в них сегментов макромолекул.

При химическом травлении в области нескольких нанометров локальная скорость растворения материала на несколько порядков превышает скорость травления неповрежденного материала. Сердцевина трека окружена диффузной оболочкой, в которой сшивание структуры преобладает над деструкцией. Диаметр сердцевины трека определяет нижний предел размеров пор, которые получают при травлении трека. В случае, когда в рабочий раствор травителя добавляются поверхностно-активные вещества (ПАВ) для повышения однородности химической обработки матрицы, происходят сложные процессы взаимодействия ПАВ с матрицей и реагентом. В частности, образовывается мономолекулярный слой ПАВ, наблюдается диффузия молекул ПАВ в поры. При быстром травлении на повышенной температуре образуются агрегаты типа цилиндрических обратных мицелл, изменяется скорость диффузии ПАВ в поры, уплотняются поверхностные слои матрицы из-за диффузии ПАВ в дефектных областях, имеет место частичная пластификация полимера и разрушение узлов флуктуационной сетки.

К эксплуатационным характеристикам трековых мембран относят: распределение пор по размерам; пористость; удельную производительность по воде и газу; прочность; заряд поверхности; адсорбционные свойства (кулоновские и гидрофобные взаимодействия).

На основании перспективности данного направления был определен следующий этап фундаментального исследования.

Этап 7. Исследование возможности стерилизации КТ с помощью трековых мембран для офтальмологического использования

Исследование проводили в лаборатории клинической микробиологии ГБУЗ «СОКБ № 1» (г. Екатеринбург). В качестве объекта исследования были взяты нестерильные КТ $\text{Ag}(10\%):\text{InP}/\text{ZnS}$ 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 использовали ТМ из политетрафторэтилена (PTFE) с диаметром

пор 50 нм. Серию растворов КТ (n=20) в разведении 1/10 к сбалансированному солевому раствору под давлением пропускали через трековую мембрану, пропущенную через сочленение между подыгольным конусом и дистальной частью канюли шприца с последующим бактериологическим посевом. В качестве контроля (n=20) растворы КТ вышеописанным способом пропускали через пустую систему сочленения шприца.

Итоги фундаментального этапа диссертационной работы определили следующий этап, заключающийся в оценке антиинфекционной активности исследуемого субстрата в лабораторных и клинических условиях.

2.4. Клинико-лабораторные исследования

Этап 1. Исследование антибактериальной активности КТ и конъюгатов на их основе в отношении антибиотикорезистентных возбудителей инфекционных офтальмологических заболеваний in vitro

На данном этапе диссертационного исследования необходимо было понять, усиливают ли квантовые точки действие антибиотика при их совместном использовании в отношении потенциальных возбудителей глазных инфекций? Если усиление действия происходит, то как концентрация субстратов влияет на этот процесс? Дополнительный вопрос заключался в необходимости использования источника возбуждения видимой области спектра для активации квантовых точек.

В качестве КТ брали 3 вида искусственных флуорофоров, оптические и люминесцентные характеристики которых описаны в предыдущем разделе Главы 2, подобранных и синтезированных по специальному техническому заданию в ФГУП «НИИ прикладной акустики», г. Дубна, Московская область: тип 1 – коллоидный раствор КТ CdTe/Cd МРА 710 10% масс., 2 тип – коллоидный раствор КТ InP/ZnSe/ZnS 650 10% масс., 3 тип – коллоидный Ag(10%):InP/ZnS МРА 10% масс. Лабораторный этап исследования проводили на базе ГАУЗ СО «Клинико-диагностический центр», г. Екатеринбург. Диско-

диффузионный метод определения чувствительности был использован в качестве эталона. Он основан на способности АБ диффундировать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности агара. В исследование были включены «музейные» (с известной чувствительностью к АБ) и внутрибольничные штаммы микроорганизмов, способные вызывать офтальмологические заболевания переднего и заднего отрезков глаза чаще всего.

Культуры микроорганизмов инкубировали в условиях термостата при 35 °С 18 часов (в темноте и под источником фотовозбуждения). Для G_r^+ микроорганизмов (*enterococcus faecalis*, *staphylococcus aureus*, *staphylococcus epidermidis*) использовали диски с Ванкомицином (30 мг) и Левофлоксацином (5 мг). Для G_r^- микроорганизмов (*escherichia coli*, *pseudomonas aeruginosa*, *klebsiella pneumonia*) 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).

Анализ эффективной зоны задержки роста (ЗЗР) (чувствительность к АБ) проводили на автоматическом бактериологическом анализаторе «ADAGIO» (Bio-rad, Франция), в основе которого лежит программное обеспечение на основе веб-приложений и визуализационной системы для измерения и анализа размера ЗЗР вокруг дисков с антибиотиками, а также для интерпретации результатов анализа на чувствительность. ADAGIO имеет встроенную экспертную систему, которая обеспечивает определение резистентных фенотипов и корректировку полученных результатов. Программное обеспечение ADAGIO также обеспечивает систему мониторинга тенденций резистентности и признаков внутрибольничных инфекций. Число последовательных измерений ($n=20$).

Для определения эффективной ЗЗР использовали стандартный микробиологический показатель эффективности динамики изменения ЗЗР по

степеням в мм: до 2 мм – умеренная эффективность; 2-5 мм – высокая эффективность; более 5 мм – очень высокая.

В качестве источника фотовозбуждения КТ (спектр излучения источника соответствовал спектру поглощения КТ) использовали светодиодную ленту, подключенную к аккумулятору бесперебойного питания и помещенную в термостат.

Среди выбранных инфекционных агентов, обладающих потенциальной возможностью вызывать инфекционный процесс в глазу, наибольший интерес представляла синегнойная инфекция глаза, обусловленный прежде всего чрезвычайно вариабельной системой факторов агрессии, инвазии и защиты этого микроорганизма [16]. В этой связи был проведен дополнительный этап по исследованию активности КТ в отношении «внутрибольничного» штамма *Pseudomonas Aeruginosa*.

В качестве объекта исследования ограничились взятием двух типов КТ: 1 – коллоидный раствор КТ CdTe/Cd МРА 710 10% масс., 2 – коллоидный раствор КТ InP/ZnSe/ZnS 650 10% масс., в силу схожести химической структуры КТ InP/ZnSe/ZnS 650 10% масс и Ag(10%):InP/ZnS МРА 10% масс.

Аналогично, диско-диффузионный метод был выбран в качестве аналитического. Культуры микроорганизмов, в количестве 30 чашек Петри инкубировали в условиях термостата при 35⁰С 18 часов (в темноте и под источником фотовозбуждения). В качестве источника фотовозбуждения (спектр излучения источника соответствовал спектру поглощения КТ) использовали светодиодную ленту, подключенную к аккумулятору бесперебойного питания и помещенную в термостат. В качестве АБ использовали диски с Цефотаксимом (5 мг), активных в отношении предполагаемых штаммов синегнойной инфекции. На каждый диск наносили по 6 мкл раствора обоих типов КТ в разведениях: 1:10, 1:100, 1:1000 (для совместного механизма действия КТ/АБ). В качестве контроля ставили чистый диск, без нанесения раствора. На завершающем этапе проводили анализ эффективной ЗЗР.

На основании данных, полученных в текущей части диссертационного исследования, подтверждающих антиинфекционную активность КТ и конъюгатов на их основе в отношении штаммов с МЛУ, необходимо проведение экспериментов на лабораторных животных, с помощью разработанной технологии лечения, чему посвящены следующие разделы диссертации.

Этап 2. Исследование доклинической эффективности разработанной технологии лечения инфекционного поражения глаза, вызванного антибиотикорезистентной G^- и G^+ микрофлорой на лабораторных животных, с помощью КТ и конъюгатов на их основе

Все этапы экспериментального исследования с участием лабораторных животных проводили согласно принципам этического кодекса, «Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза». Они включали в себя контроль суточного потребления корма и воды, суточное мониторирование температуры тела, ветеринарное сопровождение лабораторных животных.

При моделировании воспалительного процесса на переднем отрезке глаза в качестве методов динамического наблюдения использовали: клинический осмотр, фоторегистрацию с окрашиванием переднего отрезка флуоресцеином с помощью фотощелевой лампы (EyeSuite Imaging Module IM 900, США), оптическую когерентную томографию переднего отрезка с помощью оптического когерентного томографа (OptoVue Solix, США), выполненные на базе АО «Екатеринбургский центр МНТК «Микрохирургия глаза», г. Екатеринбург.

При мониторинге и статистической обработке клинической реакции на лечение анализировали параметры по разработанной 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 воспалительного процесса на заднем отрезке глаза динамическое наблюдение за течением клинического процесса производили ежедневно на протяжении 1 недели посредством фоторегистрации переднего отрезка (с помощью модульной фотоцелевой лампы BQ 900, (Haag-Streit, Швейцария)). Подопытные животные туго пеленались, ассистент фиксировал голову кролика у лобного упора прибора, после чего осуществлялась фотофиксация.

Ультразвуковую сонографию выполняли также ежедневно в течение 1 недели на ультразвуковом офтальмологическом В-сканере UD-8000 (Tomey, Япония). После тугого пеленания, на контактную поверхность датчика наносили гель, исследование проводили путем наложения контактной части датчика на верхнюю и нижнюю поверхности волосистой части верхнего и нижнего век подопытного животного в шести меридианах.

При мониторинге и статистической обработке клинической реакции на лечение анализировали параметры по разработанной шкале от 1 до 5, где 1 – минимальные проявления, 5 – максимальные проявления:

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.

Аттестацию оптических и люминесцентных характеристик, используемых конъюгатов, полученных между КТ и АБ, используемых в

экспериментах, проводили в Университетском научно-образовательном центре «Наноматериалы и нанотехнологии», г. Екатеринбург.

Все этапы моделирования и лечения инфекционно-воспалительных процессов проводили на лабораторных животных (n=87) в условиях операционного блока ветеринарной клиники ООО «Здоровье животных», г. Екатеринбург или вивария Научно-исследовательского института Фтизиопульмонологии, г. Екатеринбург. После индукции патологического процесса путем внесения различных инокулюмов и лабораторного подтверждения процесса, животных рандомно делили на группы, получавшие различные виды лечения: разработанная технология или стандартная терапия соответственно.

Следующий этап диссертационной работы требовал проведения исследований, направленных на изучение анатомического и функционального влияния КТ на зрительный анализатор для определения перспективности их последующего использования в клинической практике, особенно в вопросах возможности интравитреального введения.

2.5. Цитогистоморфологические исследования

Перед исследователем на данном этапе диссертации стоял вопрос безопасности, причем на каждом этапе организации материи, в рамках возможности ее изучения – от анатомического уровня до клеточного.

Этап 1. Исследование доклинической (анатомической и функциональной) безопасности применения КТ и конъюгатов на их основе в разработанной технологии лечения антибиотикорезистентных инфекций глазного яблока

На данном этапе было необходимо произвести интравитреальную инъекцию всех исследуемых в диссертации типов КТ в витреальную полость лабораторным животным (n=48) в различных концентрациях, в т.ч. в составе

конъюгатов с АБ для интравитреального введения с последующим изучением анатомического и функционального воздействия комплексов на зрительный анализатор с помощью стандартных офтальмологических методов исследования и методов электрофизиологической диагностики. Вопрос, который стоял перед исследователем – будут ли выявлены клинические и функциональные признаки поражения интраокулярных структур после введения в витреальную полость КТ и конъюгатов на их основе в различных концентрациях?

После проведения этапа функционального и анатомического влияния КТ на зрительный анализатор было запланировано проведение исследования тканевого и клеточного воздействия КТ и конъюгатов на их основе на зрительный анализатор.

Этап 2. Исследование клеточной и тканевой безопасности применения КТ и конъюгатов на их основе в разработанной технологии лечения антибиотикорезистентных инфекций глазного яблока

Исследование тканевого воздействия

На этапе исследования тканевого воздействия у лабораторных животных (n=27) было необходимо индуцировать острый бактериальный эндофтальмит. После постановки диагноза произвести его лечение с помощью КТ в различных концентрациях и конъюгатов на их основе. После купирования воспалительного процесса было необходимо выполнить энуклеацию глазных яблок лабораторных животных с последующим гистоморфологическим исследованием. Вопрос, который стоял на данном этапе перед исследователем, – оказывают ли токсическое воздействие КТ в различной концентрации и конъюгаты на их основе на зрительный анализатор в условиях течения патологического процесса в витреальной полости?

Исследование клеточного воздействия

Методики с использованием клеточных линий для изучения цитотоксичности в последние годы получили широкое распространение во

многих областях медицинской деятельности [28]. Применение коллекционных паспортизированных линий клеток с известными свойствами обеспечивает воспроизводимость результатов опытов по изучению характера биологической активности тестируемых соединений непосредственно на клеточном уровне, позволяет оценивать состояние клеток-мишеней прижизненно, а не «post factum» [2]. К достоинствам этих методов относятся также возможность одновременного тестирования большого числа тестируемых объектов при их минимальном расходе и получение результатов проверки в течение относительно короткого промежутка времени [5].

Изучение токсичности и безопасности новых биологически активных молекул является одним из необходимых этапов их доклинического изучения. Применение клеточных культур и методик определения цитотоксичности при оценке безопасности новых веществ позволяет уменьшить число экспериментов на животных при поиске и разработке новых эффективных препаратов, делает полученные данные прогностически более надежными при их экстраполяции на организм человека [13].

Классическим тестом для производительного скрининга на наличие цитотоксичности у соединений является колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток (МТТ-тест). Применение данной методики на раннем этапе оценки безопасности отличается быстротой получения результатов, относительной дешевизной, крайне высокой воспроизводимостью [37].

На основании вышеизложенного производили комплексную оценку цитотоксичности на культуре клеток легких эмбриона человека ЛЭЧ-4(81):

- 1) определение степени цитотоксичности квантовых точек CdTe/Cd MPA 710 (KT1), Ag (10%) InP/ZnS MPA 710 (KT2), InP/ZnSe/ZnS 650 MPA (KT3) на нефиксированной культуре ЛЭЧ-4(81) при малом увеличении микроскопа;

2) определение степени цитотоксичности квантовых точек CdTe/Cd MPA 710 (KT1), Ag (10%) InP/ZnS MPA 710 (KT2), InP/ZnSe/ZnS 650 MPA (KT3) при помощи МТТ-теста.

Изучение предусматривало: определение и оценку цитотоксического действия тестируемых препаратов на морфологию и жизнеспособность клеток, а также изучение цитотоксичности при помощи МТТ-теста.

Исследования проводили в Екатеринбургском научно-исследовательском институте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, в лаборатории клеточных культур (группа I) и респираторных вирусных инфекций (группа II).

Процедуру тестирования проводили в стерильном помещении (боксе) без вредных испарений и газов при температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

В качестве оборудования использовали:

- бокс биологической безопасности II класса ESCO (пр-во Esco Micro Pte Ltd., Сингапур);
- термостат типа ТС-80, обеспечивающий поддержание постоянной температуры $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ (пр-во Спектро Лаб, Россия);
- CO₂ инкубатор HERA cell ($37 \pm 0,2^\circ\text{C}$, 5% CO₂) (пр-во Thermo Scientific, США);
- микроскоп Primovert с камерой AxioCam 208 color (Carl Zeiss, Германия);
- микроскоп люминисцентный Axiostar plus (пр-во Carl Zeiss, Германия);
- планшетный ридер TECAN Sunrise™ (пр-во TECAN, Австрия);
- термошейкер ST-3M (пр-во Elmi, США);
- холодильник (пр-во POZIS, Россия);
- центрифуга (Россия);
- камера Горяева (пр-во Биолот, Россия).

В качестве средств измерений использовали:

- дозаторы одноканальные с переменным объемом 0,5-5000 мкл; ВЮНИТ (Sartorius, США);

- дозатор механический 8-канальный BIONIT Proline® варьируемого объема, 20-200 мкл (Sartorius, США);
- пипетки мерные вместимостью 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 см³ по ГОСТ 29227, 2-го класса точности;
- планшет культуральный 96-луночный, с обработанной поверхностью, для монослойных культур клеток РУ ФСЗ 2012/12495, ООО «Росмедбио» (Россия), срок годности до 04.2025;

Реактивы:

- среда Игла MEM с солями Эрла, с глутамином, ПанЭко (С.176, годен до 09.2023);
- среда с гидролизат лактоальбумина, ПанЭко (С.50, годен до 10.2022);
- 0,9% физиологический раствор;
- раствор Версена, ПанЭко (С.126, годен до 09/2024);
- сыворотка крови эмбриональная телячья, HyClone США (RE0000000004, годен до 03.2024);
- Хёхст краситель, ПанЭко (п.0000113668 годен до 12.2023);
- тиогликолевая среда, Оболенск (ТУ 93.98-040-78095326-2008).
- МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия), ПанЭко (С.48469, годен до 12.2024);
- диметилсульфоксид (ДМСО).

Культуры клеток:

- клеточная культура ЛЭЧ-4(81) (ЕНИИВИ, авт. свид. №3545014/28 – 13 от 27.01.1983 г.) (от 15.12.2004); (*Приложение № 1*).

Препараты:

- тестируемые вещества – квантовые точки, исходными служили нативные 10% мас. растворы КТ в объемах 0,1 мл (раствор КТ1, КТ2, КТ3).

Культивирование клеточных культур

Для эксперимента использовали диплоидную клеточную культуру ЛЭЧ-4(81) (легкого эмбриона человека) из Коллекции культур клеток ЕНИИВИ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Восстановление культуры клеток после

криоконсервации проводили по стандартной методике [24]. Культивировали клетки в смеси питательных сред: среда Игла МЕМ:ГЛА (1:1) с добавлением в качестве стимулятора роста 5% эмбриональной телячьей сыворотки в культуральных флаконах с площадью рабочей поверхности 25 см² и 75 см², при температуре +37°C с содержанием 5% CO₂. В первые сутки после пересева клетки просматривали на инвертированном микроскопе, оценивая степень прикрепления клеток. На вторые сутки определялся плотный монослой однородных фибробластоподобных клеток, обладающих ориентированным ростом, с ядрами овальной формы. Для снятия клеток использовали раствор Версена. Субкультивирование осуществляли по мере формирования монослоя с коэффициентом рассева 1:2. Для наращивания клеточной массы проводили 3 пассажа. Перед проведением опыта контролировали контаминации культур микроорганизмами.

Далее клетки из расчета посадочной дозы 2x10³ кл/лунку, пересаживали в 96-луночные планшеты.

Контроль контаминации культур микроорганизмами

Присутствие грибов и бактерий определяли микробиологическими методами. Производили посев на питательную среду контроля стерильности «Тиогликолевая среда» в соответствии ГФ XI вып. 1, 2 с. 187-193 «Испытание на стерильность». Для выявления ДНК микоплазмы в культуре использовали окраску клеток флуорохромом Хёхст [36].

Определение цитотоксического действия

Степень токсичности оценивали в культуре клеток ЛЭЧ-4(81). Клетки вносили в 96-луночные планшеты в концентрации 2x10³ кл/лунку в смеси питательных сред (Игла МЕМ:ГЛА) с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки, 10 mM глутамина и антибиотиков, и культивировали в течение 72 ч. Затем, после 2-кратной промывки культуры клеток бессывороточной средой роста, вносили предварительно подготовленные тестируемые вещества. Степень цитотоксичности определяли на нефиксированных культурах при малом увеличении микроскопа Primovert

(объектив LD Plan-ACHROMAT WF10x/20 Br.foc; окуляр 10x0,25 (Carl Zeiss, Германия) с использованием камеры Axioscam 208 color (диагональ изображения 8,1 мм или 1/2,1 дюйма (7,1 × 4,0 мм); 8,3 мегапикселя) (Carl Zeiss, Германия). Учитывали такие показатели, как целостность монослоя, степень его разрежения, характер расположения клеточных элементов. Наблюдение вели в динамике через 24, 48 часов с обязательным учетом состояния контрольных культур.

Степень указанных изменений оценивали с помощью балльной системы: полную дегенерацию культур с отделением клеток от пластика классифицировали как 4 балла, гибель примерно 75% клеточных элементов (3,50% - 2,25%) – 2 балла (Ворошилова М.К. с соавт., 1964). Минимальные изменения монослоя (дегенерация отдельных клеток по периферии монослоя) оценивали как 0,5 балла и данную концентрацию принимали за пороговую. Наименьшую концентрацию препарата, вызывающую дегенерацию примерно 50% клеток при 48-часовой экспозиции, принимали за среднетоксическую дозу (Gablík, Friedman, 1985). Определение токсичности проводили по результатам не менее трехкратности опыта.

Определение цитотоксичности веществ МТТ-тестом на культуре клеток

Для эксперимента в экспоненциальную фазу роста клетки рассеяны в 96-луночный планшет по 2×10^3 кл/лунку в объеме 100 мкл питательной среды с 5% эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки инкубировали 48 часов, затем добавляли испытуемые квантовые точки по 100 мкл в концентрациях от 1×10^{-1} до 1×10^{-5} , разведенные в 0,9% физиологическом растворе. Каждую концентрацию выполняли в трех повторениях. В качестве контроля использовали 0,9% физиологический раствор, добавляющийся в лунки в том же объеме. Планшет с внесенными соединениями помещали в CO₂-инкубатор.

МТТ-тест проводили по стандартной методике [36]. В каждую лунку планшета вносили 20 мкл раствора МТТ-реагента (концентрация 5 мг/мл), с последующей инкубацией в течение 2 часов в стандартных условиях

инкубатора. Для солюбилизации внутриклеточных фиолетовых кристаллов формазана использовали раствор ДМСО 100% в объеме 100 мкл.

Планшет помещали в шейкер на 20 минут для полного растворения образовавшегося формазана. Для оценки оптической плотности (ОП) использовали ИФА-ридер. По данным ОП раствора формазана определяли активность митохондриальных дегидрогеназ, и, косвенно оценивали долю погибших клеток под влиянием изучаемого агента.

По полученным результатам рассчитывался индекс цитотоксичности (IC) по формуле:

$$IC = \frac{ОП_{к} - ОП_{о}}{ОП_{к}} \times 100\% \quad (1),$$

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

На основании полученных данных рассчитывали показатель IC₅₀ – концентрация квантовых точек, вызывающая 50%-ное ингибирование роста клеточной культуры.

На завершающем этапе диссертации было необходимо провести исследования по непосредственной разработке лекарственного препарата, определению его потенциального места в клинической практике, а также фармакоэкономическому анализу предложенной технологии лечения с точки зрения потенциальных затрат и эффективности.

2.6. Фармакоэкономические исследования

Этап 1. Формирование требований для разработки лекарственного препарата с использованием КТ и конъюгатов на их основе для применения в офтальмологической практике

В основу требований для разработки лекарственного препарата предполагается внедрить основные результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, а именно:

- разработанные физико-химические, биологические и фармакологические характеристики КТ и конъюгатов на их основе, способные к управляемой генерации АФК, доказавшие возможность физического взаимодействия с бактериальной клеткой и продемонстрировавшие особенности взаимодействия с биологическим окружением при изменяющихся температурных характеристиках;

- доказанную клиническую эффективность, анатомическую, функциональную, тканевую и клеточную безопасность доз и методов доставки КТ и конъюгатов на их основе, полученных в ходе экспериментального лечения антибиотикорезистентных инфекционных заболеваний глаза;

- исследованные в ходе диссертационной работы методы и возможность их реализации в области стерилизации используемых форм лекарственных препаратов, входящих в основу разработанной технологии лечения;

- предложенные методы экстратемпоральной подготовки КТ и конъюгатов на их основе в составе разработанной технологии лечения;

- простота и доступность потенциального производства;

- простота и удобство применения в рутинной клинической практике.

Таким образом, требования для разработки лекарственного препарата с использованием КТ и конъюгатов на их основе, должны соответствовать следующим параметрам:

- ориентированность на офтальмопатологию,

- эффективность,

- безопасность,

- простота изготовления,

- простота использования,

- экономическая обоснованность.

Этап 2. Разработка системы фармакотерапии антибиотикорезистентных инфекций глазного яблока на основании разработанной технологии лечения

В качестве материала для разработки методов фармакотерапии пациентов с бактериальными поражениями переднего и заднего отрезков глаза должны явиться современные данные обзора литературы, результаты собственных исследований в области физико-химических и фармакологических характеристик наночастиц и конъюгатов на их основе, результаты исследований, полученные в ходе моделирования резистентных к антибактериальной терапии инфекционных поражений глазного яблока G_r^+ и G_r^- микрофлорой. Алгоритмы будут изложены и обоснованы в результатах диссертационного исследования в виде разработанных блок-схем.

Этап 3. Фармакоэкономический анализ разработанной технологии лечения бактериальной антибиотикорезистентной инфекции глаза

На сегодняшний день, в период активного развития и совершенствования медицины в целом и фармакологии в частности, подкрепленного экономически обоснованным подходом к организации здравоохранения, сформировалась новая самостоятельная фармакоэкономическая наука, которая изучает в сравнительном плане соотношение между затратами и эффективностью, безопасностью, качеством жизни при альтернативных схемах лечения (профилактики) заболевания.

Как любая наука, фармакоэкономика имеет свои методы исследований, которые подразделяются на:

- 1) Анализ стоимости болезни;
- 2) Анализ «минимизации затрат»;
- 3) Анализ «затраты-эффективность»;
- 4) Анализ «затраты-полезность»;
- 5) Анализ «затраты-выгода».

В силу сложности проведения фармакоэкономических исследований, особенно в случаях недостаточности клинических данных для прямого сравнения медицинских технологий, прибегают к методам фармакоэкономического моделирования.

В этой связи в диссертационном исследовании запланировано фармакоэкономическое моделирование лечения внутриглазной инфекции на основании метода Анализ «затраты-эффективность» у пациентов с антибиотикорезистентной внутриглазной инфекции и инфекцией переднего отрезка глаза на основании ретроспективного анализа клинических случаев ОЭ и БК, зарегистрированных в АО «Екатеринбургский центр МНТК «Микрохирургия глаза» с 2002 по 2023 год. В качестве контрольной группы будет использована модель лечения ОБПЭ и БК посредством новой технологии лечения.

Анализ «затраты – эффективность» – тип клинико-экономического анализа, при котором проводят сравнение затрат (в денежных единицах) и последствий (в натуральных единицах, например, сохраненные годы жизни, выявленные случаи, события без осложнений, предотвращенные дни госпитализации или нетрудоспособности и др.) применения двух и более лекарственных препаратов.

Для детального фармакоэкономического анализа требуется раскрытие терминов:

Древо решений – математическая модель в виде структурной диаграммы, изображающей логическую структуру выбора в условиях неопределенности, включая все релевантные альтернативные решения, доступные для лица, принимающего решение, а также ценность и вероятность всех релевантных последствий, вытекающих из этих решений.

Вероятностный узел – структурный элемент древа решений, обозначающий набор двух или более альтернативных вариантов развития событий.

Ветви дерева – структурный элемент дерева решений, линии, выходящие из узлов дерева, представляют собой возможные пути развития событий.

Пути дерева решений – это уникальные взаимоисключающие комбинации ветвей, отражающие альтернативные медицинские вмешательства и их исходы от начала до конца дерева решений.

Узел принятия решения – структурный элемент дерева решений, обозначающий принятие решения о применении одной из сравниваемых альтернатив.

Эффективность лекарственного препарата – характеристика степени положительного влияния лекарственного препарата на течение, продолжительность или предотвращение заболевания, на реабилитацию, сохранение, предотвращение или прерывание беременности.

Модель дерева решений

Одним из наиболее широко используемых типов моделей является дерево решений. Дерево решений представляет собой модель развития событий, которая позволяет увязать точки принятия решений и все их возможные последствия.

Условия применения

Дерево решений является наиболее подходящим типом модели, если временной горизонт исследования короткий, то есть, когда затраты и эффективность оцениваемых альтернатив вероятнее всего будут различаться в течение короткого промежутка времени.

Преимущества

Основное преимущество модели дерева решений состоит в ее относительной простоте разработки, корректировки, использования и анализа.

Ограничения

Дерево решений не подходит для моделирования событий, происходящих неоднократно в течение временного горизонта модели, т.к. дублирование ветвей приводит к тому, что деревья становятся слишком «густыми» и объемными, что затрудняет их использование.

Не явным допущением дерева решений является то, что события происходят мгновенно. В структуре дерева формально не учитывается время, если только разработчик модели не присвоил функцию времени определенным ветвям.

Структура дерева решений

Дерево решений представляет собой структуру возможного развития событий после какого-либо вмешательства и отражает возможные пути течения болезни у пациентов после вмешательства. На Рисунке 5 представлена часть простого дерева решений.

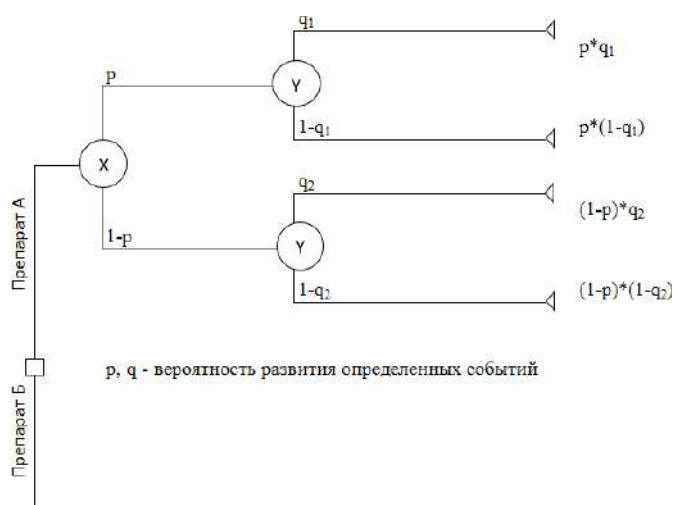


Рисунок 5 – Фрагмент дерева решений

Дерево решений начитается с узла принятия решения о применении того или иного вмешательства. События в дереве располагаются во временном порядке слева направо. Элементами дерева решений являются узлы, ветви, пути дерева, вероятности и ожидаемые значения.

Узел принятия решения – отмечен квадратом; обозначает принятие решения о применении одной из сравниваемых альтернатив.

Вероятностный узел – отмечен кругом; обозначает набор двух или более альтернативных вариантов развития событий. Поскольку заранее неизвестно, какой именно вариант развития событий произойдет с пациентом, вероятностные узлы являются точками неопределенности в дереве решений.

Терминальный узел – отмечен треугольником; терминальная точка,

замыкающая определённую уникальную последовательность развития событий (пути). В конце каждой ветви происходит расчет вероятности данного развития событий на основе правила условных вероятностей.

Ветви дерева – выходят из узлов и представляют собой возможные пути развития событий.

Этапы построения дерева решений:

1: *построение структуры дерева решений*. На первом этапе определяются все возможные решения и последующие события, они обозначаются соответствующими узлами и соединяются ветвями дерева;

2: *определение вероятностей*. На втором этапе определяются начальные вероятности и условные вероятности последующих событий дерева и затраты, возникающие в результате событий дерева.

Вероятность ветви. Каждой ветви дерева решений соответствует определенная вероятность того, что развитие событий в рамках течения заболевания пациента будет реализовываться по данной ветви дерева или, в случае моделирования когорты, что у определенной части пациентов будет реализовываться сценарий развития событий (течения заболевания) в соответствии с данной ветвью.

На Рисунке 5 после принятия решения о применении препарата А, из первого вероятностного узла (Х) выходит две ветви, обозначающие два варианта развития событий при применении препарата А, которые могут произойти с вероятностью p или не произойти с вероятностью $(1-p)$. Сумма вероятностей всех ветвей, выходящих из одного узла, равняется 1:

$$p + (1-p) = 1 \quad (2),$$

где p – вероятность наступления события.

Условные вероятности. Двигаясь слева направо, вероятностные узлы показывают последующие неопределенные события (У на Рисунке 5). Вероятности этих событий (описанные с помощью переменных q_1 и q_2) являются условными вероятностями. Условная вероятность – это вероятность наступления одного события при условии, что другое событие уже произошло.

Например, для тех пациентов, которые испытали событие X, условная вероятность события Y равна q1; для пациентов, которые не испытывали событие X, условная вероятность события Y равна q2. Таким образом, хотя возможные события одинаковы для всех вариантов, вероятности в двух частях дерева не равны.

Пути дерева решений – это уникальные взаимоисключающие комбинации ветвей, по которым может развиваться заболевание у пациента в соответствии с теми или иными событиями от начала до конца дерева решений. На Рисунке 5 представлено четыре возможных пути при применении препарата А. Все пути обладают свойством взаимоисключаемости, т.е. если течение заболевания реализовано по одному пути, то оно не может пройти по другому.

Вероятность пути равна произведению вероятности наступления первого события на условные вероятности наступления последующих событий. Сумма вероятностей всех путей при применении того или иного вмешательства равна 1:

$$p * q1 + p * (1-q1) + (1-p) * q2 + (1-p) * (1-q2) = 1 \quad (3),$$

где p, q1, q2 – вероятности наступления последующих событий

З: расчет ожидаемых значений затрат и эффективности сравниваемых лекарственных препаратов (ЛП). С каждым путем дерева решений ассоциированы затраты на течение заболевания по конкретному сценарию. Затраты пути равны сумме затрат на само вмешательство (на Рисунке 5 это препарат А) и затрат на наступления каждого из событий (X и Y).

Также с каждым путем дерева решений ассоциирована эффективность оцениваемой альтернативы при течении заболевания по данному пути. Эффективность пути может быть выражена различными способами. В частности, в качестве релевантной меры эффективности может быть использована вероятность успешного лечения (например, вероятность

отсутствия событий X и Y: ожидаемая эффективность таких путей приравнивается к 1, а всех других путей – к значению 0). Недостатком такого подхода является то, что все другие пути имеют одинаковое (нулевое) значение. Более информативным методом является выражение эффективности каждого пути в числе дней без болезни, годах жизни и годах жизни с поправкой на качество (QALY).

Ожидаемые значения затрат и эффективности. Ожидаемая стоимость оцениваемых альтернатив рассчитывается путем взвешивания стоимости каждого пути относительно соответствующей вероятности пути, а затем суммирования полученных значений всех путей:

$$\text{Ожидаемая стоимость (Препарат A)} = \sum P_i * C_i \quad (4),$$

где i – путь дерева решений, P_i – вероятность пути i , C_i – затраты пути i .

Ожидаемая эффективность оцениваемых альтернатив рассчитывается путем взвешивания эффективности каждого пути относительно соответствующей вероятности пути, а затем суммирования полученных значений ожидаемой эффективности всех путей:

$$\text{Ожидаемая эффективность (Препарат A)} = \sum P_i * E_i \quad (5),$$

где i – путь дерева решений, P_i – вероятность пути i , E_i – эффективность пути i .

4а: расчет инкрементного показателя «затраты-эффективность» для анализа «затраты-эффективность» или «затраты-полезность». Инкрементный показатель «затраты-эффективность» рассчитывается как соотношение разницы в затратах между рассматриваемым препаратом и препаратом сравнения, включенными в исследование, и разницы в их эффективности:

$$ICER = \frac{C_1 - C_2}{Ef_1 - Ef_2} \quad (6),$$

где C – затраты, Ef – эффективность препаратов.

4б: расчет разницы общих затрат для анализа минимизации затрат.

Результат анализа минимизации затрат представляется в виде разницы в затратах между рассматриваемым препаратом и препаратом сравнения, изучаемыми в исследовании.

На основании описанных данных внутренней структуры метода построения дерева решений можно перейти к материалу, используемому в фармакоэкономическом анализе.

Фармакоэкономическое обоснование перспективы клинического применения разработанной технологии лечения антибиотикорезистентной внутриглазной инфекции

Материал: клиническая группа 100 человек, гендерно-возрастная характеристика представлена в Таблице 1.

Таблица 1 – Гендерно-возрастная характеристика пациентов с ОЭ, вошедших в группу анализа

Характеристика	N	%
Всего человек	100	
Женщины	49	49
Мужчины	51	51
		Интервал
Средний возраст	70,36	4-96
Женщины	70,03	4-96
Мужчины	70,67	30-93

Контрольная группа: модель пациента с ОЭ, пролеченного посредством однократного ИВВ конъюгата КТ – CdTe/Cd МРА 710 0,01%/0,05 мл в сочетании с 0,05 мл Ванкомицина или Цефтазидима, в зависимости от этиологии инфекционного процесса.

Расчет стоимости лечения:

- тариф на оказание услуг в рамках территориальной программы государственных гарантий Министерства здравоохранения Свердловской области на 2023 год указан в Таблице 2, наименование клинико-статистической группы – в Таблице 3.

Таблица 2 – Тариф территориальной программы государственных гарантий (ТПГГ) круглосуточного и дневного стационара

Стационар	Норматив финансовых затрат, руб.	ПК	КСГ
Круглосуточный (1)	39 385,00 ₽	0,65	st21.005
Круглосуточный (1)	39 385,00 ₽	0,65	st21.006
Дневной (2)	23 885,90 ₽	0,6	ds21.006

Таблица 3 – Наименование клинико-статистической группы (КСГ)

Наименование КСГ	Наименование услуги	КЗ	Тариф на 1 случай, руб.
Операции на органе зрения (уровень 5)	ИВВ ЛП	2,11	54 016,53 ₽
Операции на органе зрения (уровень 6)	Витреозэктомия	3,29	84 224,82 ₽
Операции на органе зрения (уровень 5)	ИВВ ЛП	3,5	50 160,39 ₽

- расчет затрат медицинской организации на услуги – планово-экономический отдел АО «Екатеринбургский центр МНТК «Микрохирургия глаза» от 01/2023 указан в Таблице 4.

Таблица 4 – Расчет затрат медицинской организации, стандартные вмешательства

Вмешательство	Тариф, руб.
Витреозэктомия + ИВВ конъюгата Ванкомицина + Цефтазидима	96 900,03 ₽
ИВВ конъюгата Ванкомицина + Цефтазидима	33 550,10 ₽
ИВВ конъюгата Ванкомицина или Цефтазидима + КТ в рамках дневного стационара	33 555,10 ₽
Реоперация	36 600,15 ₽
Реоперация (для КТ)	36 605,15 ₽

- расчет стоимости КТ – договор на поставку КТ № 223/2/31, Научно-исследовательский институт прикладной акустики, г. Дубна Московская область.

Стоимость КТ CdTe/Cd 10% – 100 000 руб. – 100 мл

Доза для ИВВ 0,05 мл/0,01 % раствор – **5 рублей.**

Фармакоэкономическое обоснование перспективы клинического применения разработанной технологии лечения антибиотикорезистентной инфекции переднего отрезка глаза

Материал: клиническая группа 90 человек, гендерно-возрастная характеристика представлена в Таблице 5.

Таблица 5 – Гендерно-возрастная характеристика пациентов с БК, вошедших в группу анализа

Характеристика	N	%
Всего человек	90	
Женщины	43	49
Мужчины	47	51
		Интервал
Средний возраст	39,21	11-57
Женщины	37,16	11-54
Мужчины	38,44	12-57

Контрольная группа: модель пациента с БК, пролеченного посредством 7-дневной (4 раза в сутки) эпibuльбарной инстилляцией конъюгата КТ в комплексе с Левофлоксацином/Тобрамицином (в зависимости от этиологии процесса), заключающийся в добавлении к 5 мл нативного раствора АБ 0,05 % раствора КТ InP/ZnSe/ZnS 650 в объеме 1 мл (для получения концентрации 0,01%).

Расчет стоимости лечения:

- тариф на оказание услуг в рамках ТППГ Министерства здравоохранения Свердловской области на 2023 год представлен в Таблице 6.

Таблица 6 – Стоимость услуг, оказываемых в рамках ТППГ у пациентов с БК

Вмешательство	Тариф, руб.
Первичный прием офтальмолога	500,00 Р
Повторный прием офтальмолога	500,00 Р
Лечение в стационаре	11 707,63 Р
Кератопластика	94 407,11 Р

- расчет затрат медицинской организации на услуги – планово-экономический отдел АО «Екатеринбургский центр МНТК «Микрохирургия глаза» от 01/2023 приведены в Таблице 7.

Таблица 7 – Стоимость услуг, оказываемых в рамках затрат медицинской организации у пациентов с БК

Вмешательство	Тариф, руб.
Первичный прием офтальмолога	5 000,00 Р
Повторный прием офтальмолога	1 500,00 Р
Лечение в стационаре	11 707,63 Р
Кератопластика	94 407,11 Р
Дополнительные лечебные процедуры (лекарственные препараты)	7 000,00 Р

- расчет стоимости КТ – договор на поставку КТ № 223/2/31, Научно-исследовательский институт прикладной акустики, г. Дубна Московская область.

Стоимость КТ КТ InP/ZnSe/ZnS 650 10% – 100 000 руб. – 100 мл

Доза для эпибульбарной инстилляцией (курс лечения во флаконе) 1 мл/0,01% раствор – **50 рублей.**

2.7. Статистические и математические методы обработки данных

Статистическую обработку результатов проводили, используя компьютерные программы «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.

Математическая обработка данных, полученных в ходе доклинических исследований эффективности КТ и конъюгатов на их основе.

Для каждого анализируемого признака выводили показатель динамики обратного развития симптомов (k_i^n) :

$$k_i^n = \frac{1}{9} \sum_{j=1}^9 M_{ij}^n, i=1 \div 5, n=1 \div 3 \quad (7),$$

где: M_{ij}^n – балл состояния i-го признака у j-го кролика, n – номер соответствующего метода 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) :

$$K^n = \frac{1}{5} \sum_{i=1}^5 k_i^n, n=1 \div 3 \quad (8),$$

где: k_i^n – показатель динамики обратного развития симптомов, n – номер соответствующего метода лечения.

Соответственно, метод лечения, имеющий показатель от 4 до 5, можно характеризовать как эффективный; методы, имеющие показатели от 1 до 3, – низкоэффективные и умеренно эффективные соответственно.

Глава 3. РЕТРОСПЕКТИВНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ МИКРОФЛОРЫ С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И АНАТОМИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ

Целью данной главы явилось ретроспективное исследование частоты встречаемости антибиотикорезистентной микрофлоры в структуре воспалительных заболеваний переднего и заднего отрезков глаза бактериальной этиологии для разработки новой технологии лечения антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза.

Для достижения поставленной цели было необходимо провести ретроспективный анализ клинико-функциональных результатов лечения бактериальных инфекций переднего и заднего отрезков глаза, а также оценить влияние микрофлоры с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) на частоту анатомической потери глаза как органа на завершающем этапе лечения.

3.1. Клинико-функциональные и анатомические результаты лечения бактериальных инфекций переднего отрезка глаза, влияние микрофлоры с множественной лекарственной устойчивостью на исходы лечения

Клинико-функциональные результаты проанализированы у 1837 пациентов, обратившихся в АО «Екатеринбургский центр МНТК «Микрохирургия глаза», г. Екатеринбург (далее – Центр) в период с 2017 по 2023 гг. (Рисунки 6, 7).

Частота встречаемости кератитов, выявленных в Центре в зависимости от этиологического агента, представлена в Таблице 8.



Рисунок 6 – Пример острого бактериального кератита, осложненного язвой роговицы с переходом в эндофтальмит.

Архивное фото, Екатеринбургский центр, 2020 год



Рисунок 7 – Состояние после аутоконъюнктивопластики осложненной язвы роговицы с переходом в эндофтальмит.

Архивное фото, Екатеринбургский центр, 2020 год

Таблица 8 – Частота встречаемости кератитов в зависимости от этиологии патологического процесса

Этиология процесса	Количество случаев, абс. (%)
Бактериальный	1121 (61%)
Протозойный	36 (1,9%)
Грибковый	113 (6,1%)
Вирусный	429 (23,3%)
Неуточненный	138 (7,7%)
Итого	1837 (100%)

В свою очередь внутривидовое распределение бактериальных кератитов с определением чувствительности к АБ представлено в Таблице 9, где А – микроорганизм чувствителен к двум и более АБ; В – микроорганизм чувствителен к одному АБ; С – микроорганизм не чувствителен к АБ (антибиотикорезистентный).

Таблица 9 – Внутривидовое распределение бактериальных кератитов, выявленных в Центре

Возбудитель	Кол-во	А	В	С
<i>Pseudomonas</i> spp.	191	156	23	12
<i>Staphylococcus</i> spp.	484	460	13	11
<i>Streptococcus</i> spp.	180	128	49	3
<i>Enterococcus</i> spp.	132	107	18	7
<i>Nocardia</i> spp.	74	62	12	0
<i>Moraxella</i> spp.	33	27	6	0
<i>Serratia</i> spp.	27	20	7	0
Итого, n (%)	1121(100%)	960(85,6%)	128(11,4%)	33(2,94%)

Зависимость функциональных (острота зрения) и анатомических (сохранность глазного яблока) показателей от чувствительности микроорганизма к АБ представлена в Таблице 10.

Таблица 10 – Зависимость функциональных и анатомических показателей от чувствительности микроорганизма к АБ

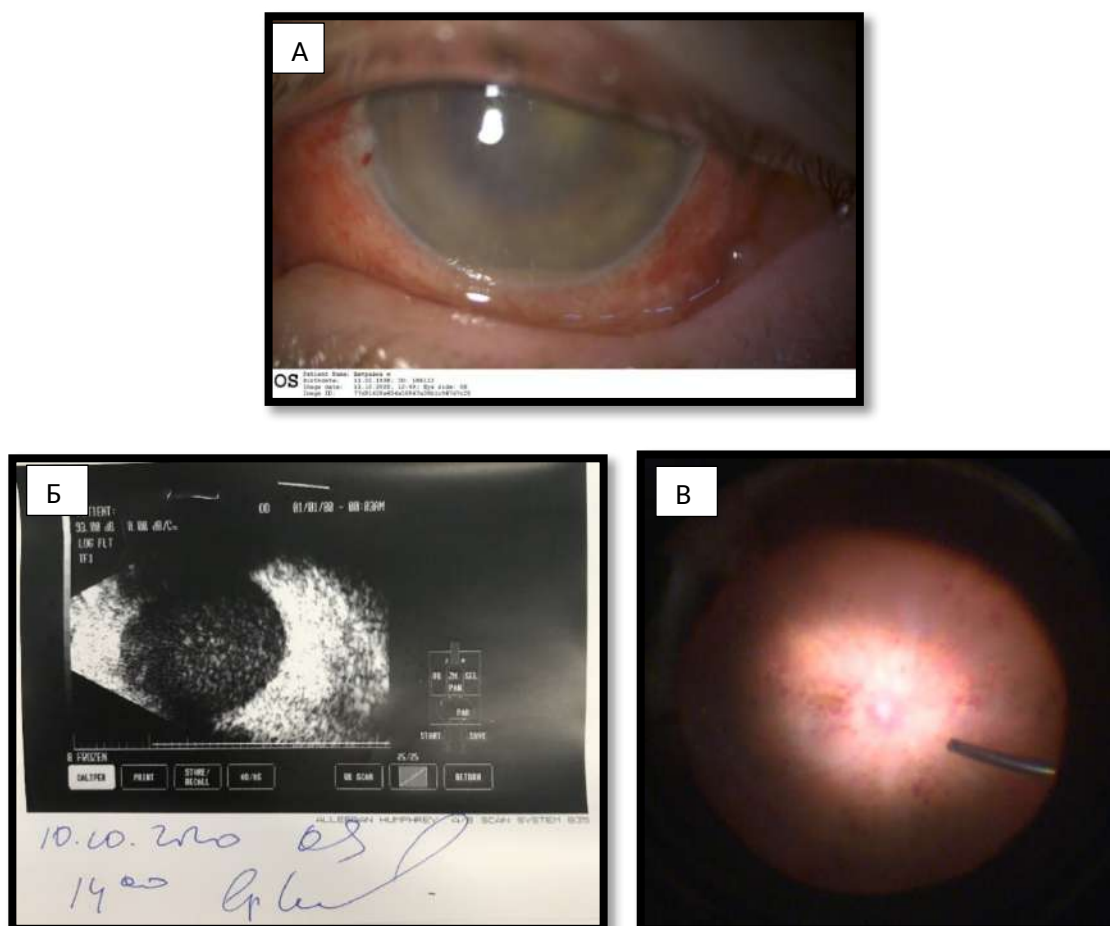
Острота зрения при поступлении	От gr. I. certae до 0,7 (ср. 0,15 ±0,73)		
Чувствительность	А	В	С
Острота зрения при выписке (ср.)	0,45±0,12	0,3±0,26	0,15±0,21
Сохранность глазного яблока, абс. (%)	960 (100%)	128 (100%)	29(87,8%)

По частоте встречаемости инфекционных заболеваний переднего отрезка, выявленных в АО «Екатеринбургский центр МНТК «Микрохирургия глаза», бактериальные кератиты занимают 1-е место, в свою очередь 2-е и 3-е место занимают вирусные и грибковые процессы соответственно. При этом, в структуре бактериальных кератитов антибиотикорезистентные штаммы (резистентность ко всем АБ) выявлены в 2,94% случаев. В этой группе функциональные и анатомические результаты лечения включают в себя потерю глазного яблока как органа в 4 случаях (12,2%) и отсутствие положительной динамики по прибавки зрительных функций на завершающем этапе стационарного лечения ($p \leq 0,05$).

3.2. Клинико-функциональные и анатомические результаты лечения бактериальных инфекций заднего отрезка глаза, влияние микрофлоры с множественной лекарственной устойчивостью на исходы лечения

Для респективного анализа были отобраны 100 амбулаторных карт пациентов, обратившихся за медицинской помощью в Центр в период 2002-2023 гг. (Рисунок 8).

Частота встречаемости инфекционных заболеваний заднего отрезка, выявленных в Центре в зависимости от этиологического агента, представлена в Таблице 11.



А – Фотография переднего отрезка

Б – Ультразвуковая сонография

В – Интраоперационная картина глазного дна

Рисунок 8 – Пример острого бактериального эндофтальмита, возникшего на 5-е сутки после хирургии катаракты.

Архивное фото, Екатеринбургский центр, 2020 год

Таблица 11 – Частота встречаемости инфекционных заболеваний заднего отрезка в зависимости от этиологии патологического процесса

Этиология процесса	Кол-во случаев, абс. (%)
Бактериальный	87 (87%)
Грибковый	13 (13%)
Итого	100 (100%)

В свою очередь внутривидовое распределение бактериальных инфекций заднего отрезка с определением чувствительности к АБ представлено в Таблице 12.

Таблица 12 – Внутривидовое распределение бактериальных инфекций заднего отрезка, выявленных в Центре

Возбудитель	Кол-во	А	В	С
<i>Pseudomonas</i> spp.	13	0	5	8
<i>Staphylococcus</i> spp.	47	13	25	9
<i>Streptococcus</i> spp.	4	1	1	2
<i>Enterococcus</i> spp.	23	10	7	6
Итого, n (%)	87 (100%)	24 (27,5%)	38 (43,6%)	25(28,7%)

Зависимость функциональных (острота зрения) и анатомических (сохранность глазного яблока) показателей от чувствительности микроорганизма к АБ представлена в Таблице 13.

Таблица 13 – Зависимость функциональных и анатомических показателей от чувствительности микроорганизма к АБ

Острота зрения при поступлении	От gr. I. certae до 0,4 (ср. 0,2 ±0,22)		
Чувствительность	А	В	С
Острота зрения при выписке (ср.)	0,25±0,17	0,2±0,23	0,05±0,34
Сохранность глазного яблока (абс./%)	24 (100%)	38 (100%)	23 (92%)

По частоте встречаемости инфекционных заболеваний заднего отрезка, выявленных в Екатеринбургском центре МНТК «Микрохирургия глаза», бактериальные эндофтальмиты занимают лидирующее место. При этом в структуре бактериальных процессов антибиотикорезистентные штаммы (резистентность ко всем АБ) выявлены в 28,7% случаев. В этой группе Функциональные и анатомические результаты лечения демонстрируют

потерю глазного яблока как органа в 2 случаях (8%) в совокупности с регрессом прибавки зрительных функций на завершающем этапе стационарного лечения ($p \leq 0,05$).

Таким образом, 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.

Глава 4. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ, БИОЛОГИЧЕСКИХ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КВАНТОВЫХ ТОЧЕК И КОНЬЮГАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ

Целью данной главы явилось фундаментальное обоснование возможности применения созданных и адаптированных для офтальмологической практики полупроводниковых квантовых точек и конъюгатов на их основе в лечении антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза, а также исследование их базовых антиинфекционных свойств.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

- разработать адаптированные квантовые точки для офтальмологического использования;
- исследовать способность квантовых точек к генерации активных форм кислорода при возбуждении источниками освещения с заданной длиной волны;
- изучить особенности физического взаимодействия квантовых точек с бактериальной клеткой посредством электронной микроскопии, а также исследовать особенности динамического изменения структуры бактериальной клетки при проникновении в нее квантовых точек;
- создать конъюгаты на основе квантовых точек и антибиотиков, провести исследование их физико-химического взаимодействия: ингибирование, инактивация, синергизм, нейтральные взаимоотношения
- изучить влияние внешних факторов, таких как температурные изменения, биологическое окружение, на активность квантовых точек с целью прогнозирования их функционирования в условиях гомеостаза организма;
- исследовать возможность стерилизации квантовых точек для последующего офтальмологического использования.

4.1. Разработка и синтез квантовых точек для офтальмологического применения

На основании технического задания, поставленного Научно-исследовательскому институту «Прикладной акустики», г. Дубна Московская область, было синтезировано три типа КТ, отвечающих заданным параметрам по физическим, химическим и спектральным характеристикам, максимально приближенных к возможности применения в офтальмологической практике.

Синтезированные КТ представлены следующими техническими паспортами:

Тип № 1. Квантовые точки InP/ZnSe/ZnS 650 МРА, представляющие собой 3-оболочечную структуру, диаметром $8 \pm 1,5$ нм (Рисунки 9-12, Таблица 14).

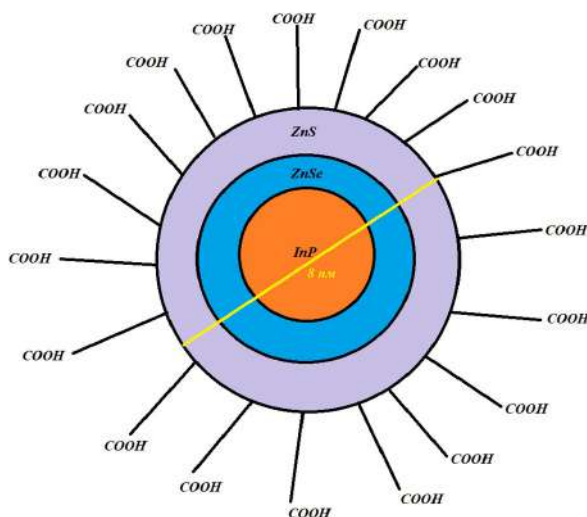


Рисунок 9 – Модель трехоболочечной КТ типа InP/ZnSe/ZnS 650 МРА



Рисунок 10 – Трехблочечная КТ InP/ZnSe/ZnS 650 МРА в кувезе для спектрофотометрии в ультрафиолетовой области (продемонстрирован эффект флуоресценции в ультрафиолетовой области)

Таблица 14 – Физико-химические характеристики КТ InP/ZnSe/ZnS 650 МРА

Характеристика	Значение
Форма поставки	Дисперсия
Концентрация	10% масс.
Объем	100 мл
Растворитель	Вода
Свойства поверхности	Меркаптопропионовая кислота, функциональные группы -COOH. Противоион тетраметиламмоний
Квантовый выход	13%
Длина волны флуоресценции	650 нм
Ширина пика на полувысоте	80 нм
Срок хранения	12 месяцев
Условия хранения	В плотно закрытой таре, при +4°C, влажность 20-80%

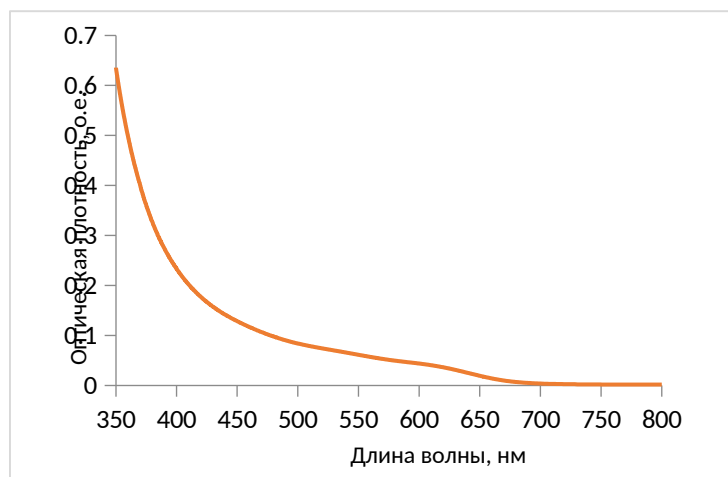


Рисунок 11 – Спектральные характеристики КТ InP/ZnSe/ZnS 650 МРА.
Спектр поглощения широкий (соответствует видимой области спектра)

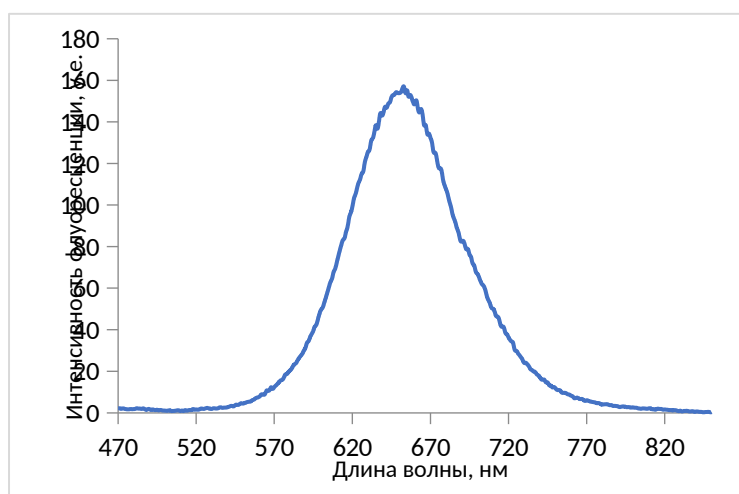


Рисунок 12 – Спектральные характеристики КТ InP/ZnSe/ZnS 650 МРА.
Спектр флуоресценции узкий – минимизация токсических эффектов на
ретиальные структуры (пик 650 нм)

Из представленного видно, что КТ типа InP/ZnSe/ZnS 650 МРА по вышеописанным характеристикам соответствуют заявленному техническому заданию, представляя собой 10% водную дисперсию, диаметром $8 \pm 1,5$ нм, функционализированную карбоксильными группами, квантовый выход при этом составляет 13%, что оптимально для потенциальной активности в отношении образования АФК, спектральные характеристики соответствуют широкому спектру поглощения и узкому спектру флуоресценции.

Тип № 2. КТ CdTe/Cd 710 МРА, представляющие собой двухоболочечную структуру, диаметром $6 \pm 1,5$ нм (Рисунки 13-16, Таблица 15).

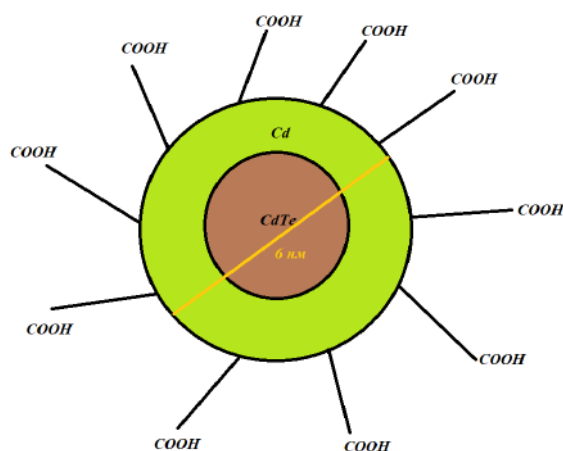


Рисунок 13 – Модель двухоболочечной КТ CdTe/Cd 710 МРА



Рисунок 14 – Двухоболочечная КТ CdTe/Cd 710 МРА в транспортировочном контейнере, на этапе тестирования путем возбуждения в ультрафиолетовой области спектра

Таблица 15 – Физико-химические характеристики КТ CdTe/Cd 710 МРА

Характеристика	Значение
Форма поставки	Дисперсия
Концентрация	10% масс.
Объем	100 мл
Растворитель	Вода

Свойства поверхности	Меркаптопропионовая кислота, функциональные группы -COOH. Противоион тетраметиламмоний
Квантовый выход	7%
Длина волны флуоресценции	710 нм
Ширина пика на полувысоте	34 нм
Срок хранения	12 месяцев
Условия хранения	В плотно закрытой таре, при +4°C, влажности 20-80%

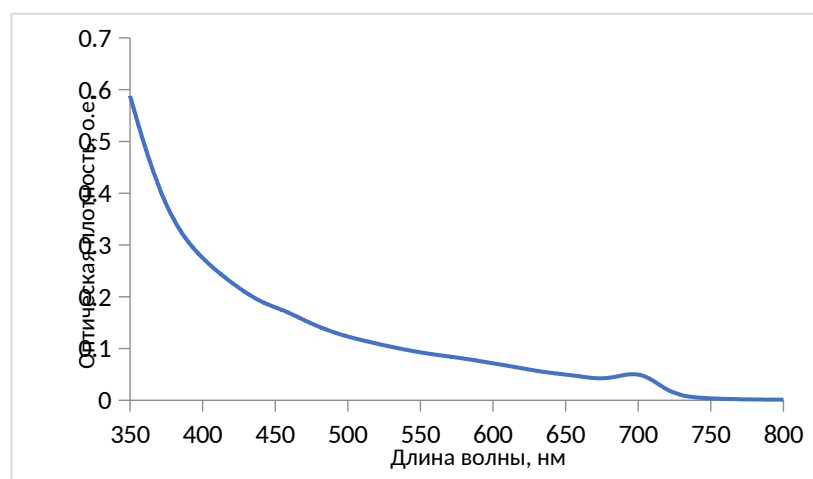


Рисунок 15 – Спектральные характеристики КТ типа CdTe/Cd 710 МРА.
Спектр поглощения широкий (соответствует видимой области спектра)

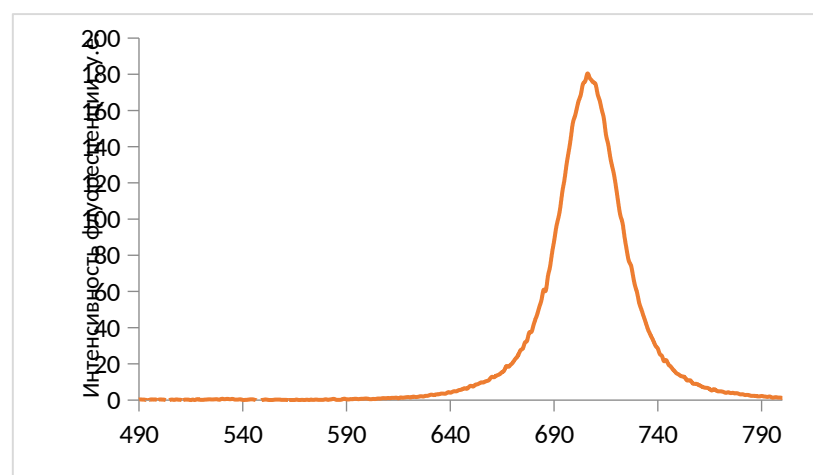


Рисунок 16 – Спектральные характеристики КТ типа CdTe/Cd МРА 710.
Спектр флуоресценции узкий – минимизация токсических эффектов на
ретиальные структуры (пик 710 нм)

Аналогичным образом, из представленного видно, что КТ CdTe/Cd 710 МРА по вышеописанным характеристикам соответствуют техническому заданию, представляя собой 10% водную дисперсию, диаметром $6,0 \pm 1,5$ нм, функционализированную карбоксильными группами, квантовый выход, однако, при этом составляет около 7%, что также является оптимальным для потенциальной активности в отношении образования АФК, спектральные характеристики соответствуют широкому спектру поглощения и узкому спектру флуоресценции, как и у вышеописанного типа КТ.

Тип № 3. КТ Ag(10%):InP/ZnS МРА, представляющие собой двухоболочечную структуру, диаметром $5,0 \pm 1,5$ нм, пассивированные 10% молекулами серебра, обладающие дополнительными антиинфекционными свойствами (Рисунки 17-20, Таблица 16).

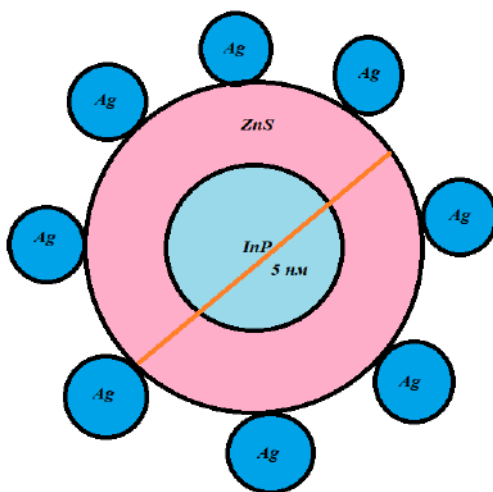


Рисунок 17 – Модель двухоболочечной КТ типа Ag(10%):InP/ZnS МРА

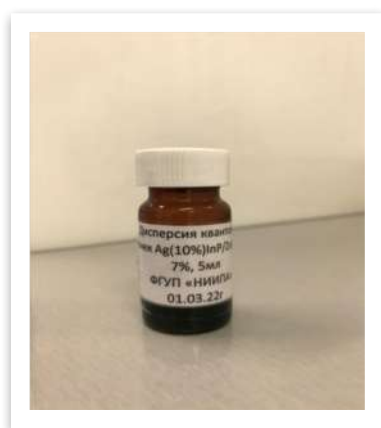


Рисунок 18 – Двухоболочечная КТ типа Ag(10%):InP/ZnS МРА в транспортировочном контейнере (неактивное состояние)

Таблица 16 – Физико-химические характеристики КТ типа Ag(10%):InP/ZnS МРА

Характеристика	Значение
Форма поставки	Дисперсия
Концентрация	7%
Объем	5 мл
Растворитель	Вода
Свойства поверхности	3-меркаптопропионовая кислота, противоион тетраметиламмоний
Квантовый выход	0,1%
Длина волны флуоресценции	795 нм
Ширина пика на полувысоте	132 нм
Срок хранения	12 месяцев
Условия хранения	В плотно закрытой таре, при +4°C, в темном месте, влажность 20-80%

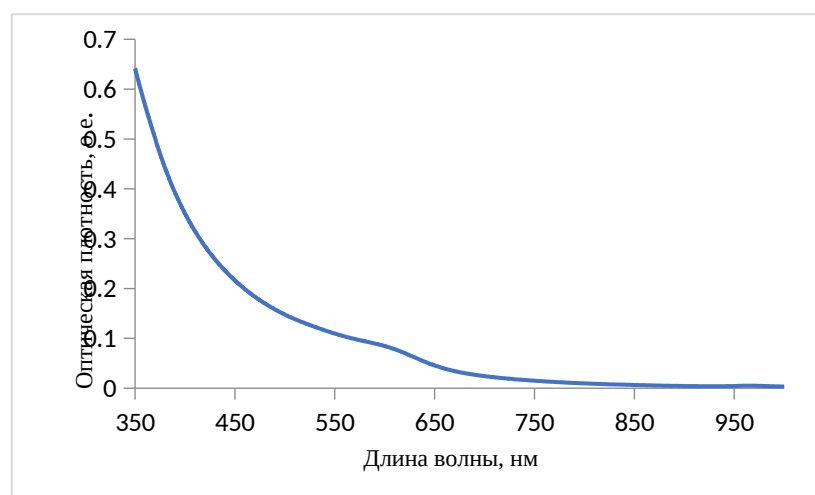


Рисунок 19 – Спектральные характеристики КТ Ag(10%):InP/ZnS МРА.
Спектр поглощения широкий (соответствует видимой области спектра)

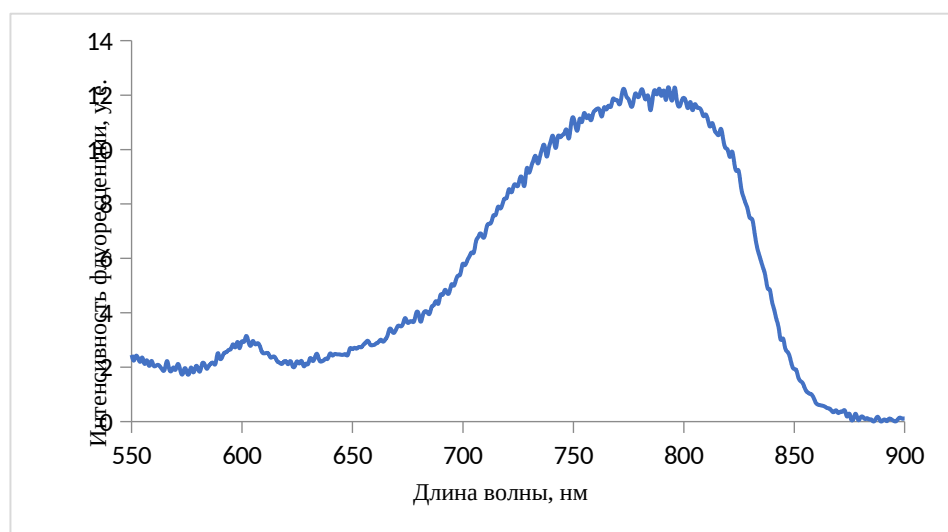


Рисунок 20 – Спектральные характеристики КТ Ag(10%):InP/ZnS МРА.
Спектр флуоресценции умеренно узкий – минимизация токсических
эффектов на ретинальные структуры (пик 750-780 нм)

Из представленного видно, что КТ типа Ag(10%):InP/ZnS МРА по вышеописанным характеристикам полностью соответствуют заявленному техническому заданию, представляя собой 7% водную дисперсию, диаметром $5,0 \pm 1,5$ нм, пассивированную 10% молекулами серебра; более того, квантовый выход данного типа КТ составляет 0,1%, что в практически в 10 раз превосходит представленные выше аналоги и может свидетельствовать о более высокой потенциальной активности в отношении образования АФК,

спектральные характеристики соответствуют широкому спектру поглощения и умеренному диапазону спектра флуоресценции.

В результате данного этапа исследования были разработаны адаптированные для офтальмологической практики различные типы КТ, физико-химические и спектральные характеристики которых объединены общими свойствами, которые заключаются в улучшенной химической стабильности КТ и уменьшенном периоде полураспада, за счет обработки поверхности 3-меркаптопропионовой кислотой и введения противоиона тетраметиламмония; ширина пиков на полувысоте узкая (ширина на полувысоте менее 150 нм), что 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 квантовых точек и генерация АФК возможны при дневном свете); спектры флуоресценции всех типов КТ смещены в инфракрасную область спектра (минимальный риск повреждения нейроретинальных структур).

4.2. Исследование способности квантовых точек к генерации активных форм кислорода и скорости их образования при облучении светом в видимом диапазоне длин волн и при изменении рН среды

В результате данной части исследования были разработаны методики, позволяющие оценить возможность и скорость генерации квантовыми точками АФК, обладающими свойствами окислителей (Ox) и восстановителей (Red).

Как было описано ранее, одним из механизмов антиинфекционной активности КТ в отношении возбудителей инфекционных заболеваний является их способность к образованию химически активных соединений (активные формы кислорода, перекиси и др.). Их образование индуцируется неспаренными электронами на внешнем энергетическом уровне КТ, которые

активное взаимодействие с кислородом, водой и др. соединениями. Обычно эти реакции называют окислительными, а в некоторых случаях окислительно-восстановительными. Установить данный процесс можно посредством введения в химическую реакцию так называемых индикаторов реакций, в качестве которых в данном случае выступают фотовосстановитель цитохром С (CytC), и окислитель дигидрородамин (ДГРМ).

Исследование фотовосстановления цитохрома С (CytC) дисперсиями КТ

Фотовосстановление CytC проводили в буфере физраствора с pH 11,5 (при меньшем pH наблюдалось восстановление CytC в темноте). Предварительно готовили 2,5 мл дисперсии КТ CdTe/Cd с концентрацией 80 нМ (0,12% масс). Образец помещали в кювету и записывали базовую линию. Далее, избегая прямого попадания света на образец, вносили CytC до концентрации 15 мкМ. Записывали спектр поглощения образца. Затем образец в кювете облучали светодиодной лампой 1 мин и снова записывали спектр. Операции повторяли до достижения общего времени облучения 5 мин.

Аналогично исследовали дисперсии КТ Ag(10%):InP/ZnS и InP/ZnSe/ZnS с концентрациями 0,03% и 0,042% масс, соответственно, при этом фиксировали равные оптические плотности дисперсий для всех образцов на длине волны облучения (450 нм). Равные оптические плотности образцов на длине волны облучения подразумевают одинаковое количество поглощенных образцом фотонов в единицу времени. Степень восстановления CytC отслеживали по возникновению характерного пика на 550 нм. Рассчитывали относительное значение оптической плотности данного пика как $A(\text{пика}) = A(550 \text{ нм}) - A(565 \text{ нм})$, где оптическая плотность A на 565 нм соответствует значению локального минимума восстановленной формы CytC. Строили зависимость $A(\text{пика})$ от времени облучения (Рисунок 21). Для корректного сравнения начальных скоростей фотореакции начальные скорости восстановления, полученные в эксперименте, нормировали на молярный

коэффициент экстинкции восстановленной формы CytC на 550 нм ($28000 \text{ l/cm} \cdot \text{M}$).

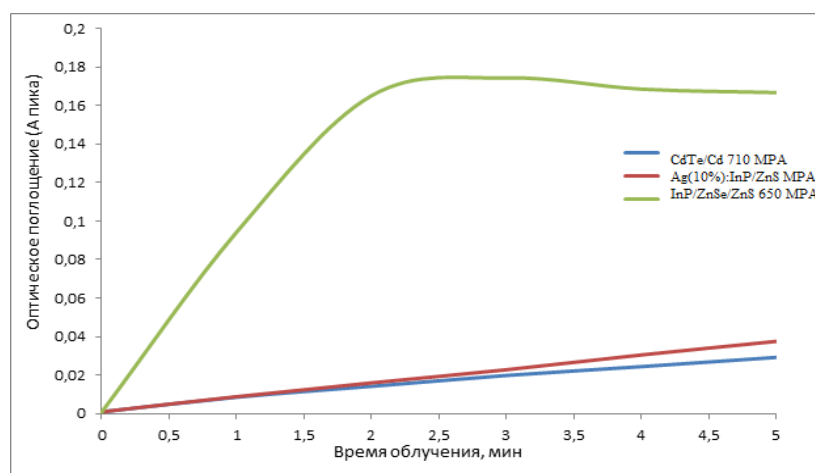


Рисунок 21 – Кинетика **восстановления** CytC. Нормировка по оптической плотности КТ на длине волны облучения (450 нм), демонстрирующая зависимость генерации АФК от концентрации раствора и времени облучения

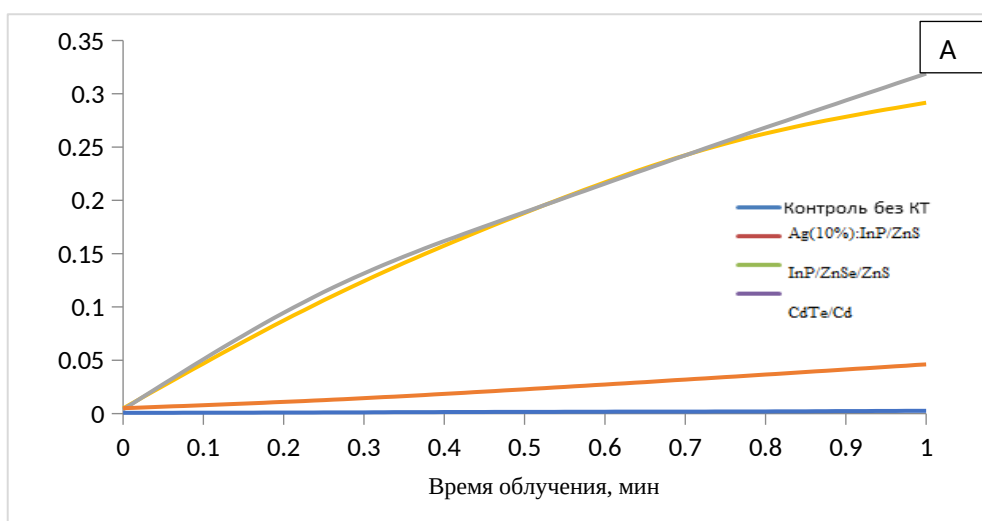
Нормирование оптической плотности на $A(\text{пик})$ – аттестационная процедура, демонстрирующая зависимость концентрации КТ в исследуемом растворе (например, в нашем случае 0,12%, 0,03% и 0,042% масс соответственно) от времени облучения. Из Рисунка 21 видно, что при данных нормированных концентрациях регистрируется наибольший $A(\text{пик})$ для индиевых КТ (салатовый цвет) (с 0 до 2 минуты облучения), несколько меньший для кадмиевых и аргентумных (красный и синий), что является нормированным показателем генерации АФК посредством восстановления CytC. Аналогичные измерения проводились для дигидрородамина.

Исследование фотоокисления дигидрородамина (ДГРМ) дисперсиями КТ

Фотоокисление ДГРМ проводили в буфере физраствора с pH 11,5 и pH 7,5. Предварительно готовили 2,5 мл дисперсии КТ CdTe/Cd с концентрацией 40 нМ (0,06% масс.). Образец помещали в кювету и записывали базовую линию. Далее, избегая прямого попадания света на образец, вносили 1%

спиртовой раствор ДГРМ до конечной концентрации 0,01%. Записывали спектр поглощения образца. Затем образец в кювете облучали светодиодной лампой 15 секунд и снова записывали спектр. Операции повторяли до достижения общего времени облучения 1 мин.

Аналогично исследовали дисперсии КТ Ag(10%):InP/ZnS и InP/ZnSe/ZnS с концентрациями 0,014% и 0,021% масс. соответственно, при этом фиксировали равные оптические плотности дисперсий для всех образцов на длине волны облучения (450 нм). Степень окисления ДГРМ отслеживали по возникновению характерного пика на 530 нм. Рассчитывали относительное значение оптической плотности данного пика как $A(\text{пика}) = A(530 \text{ нм}) - A(575 \text{ нм})$, где оптическая плотность A на 575 нм соответствует значению локального минимума спектра родамина 6G. Строили зависимость A (пика) от времени облучения (Рисунок 22).



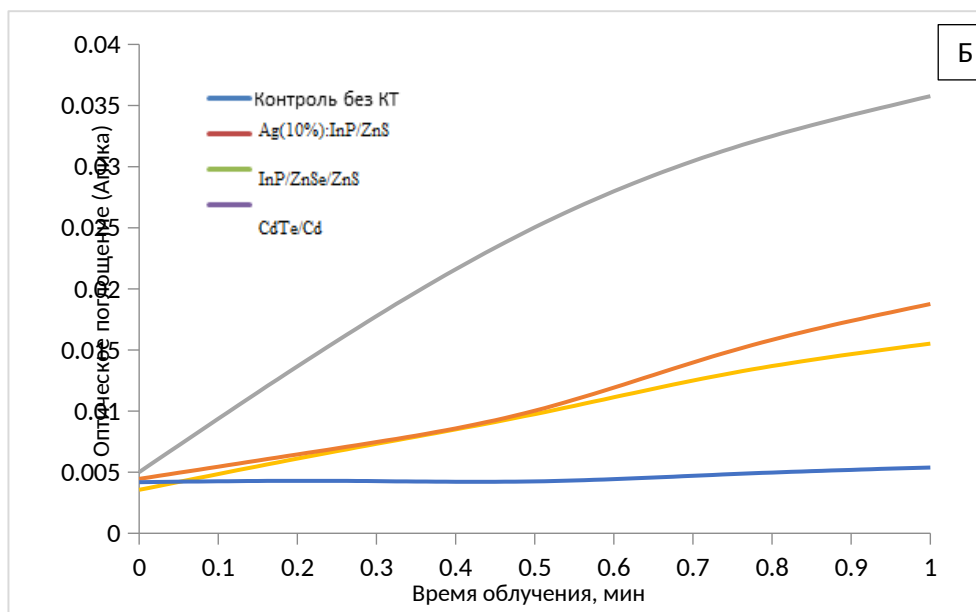
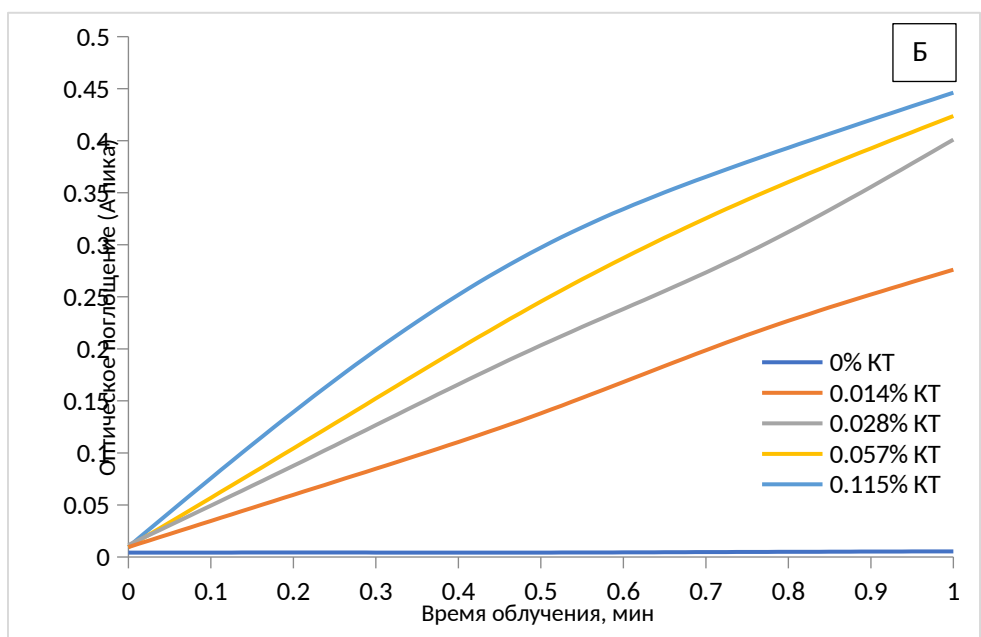
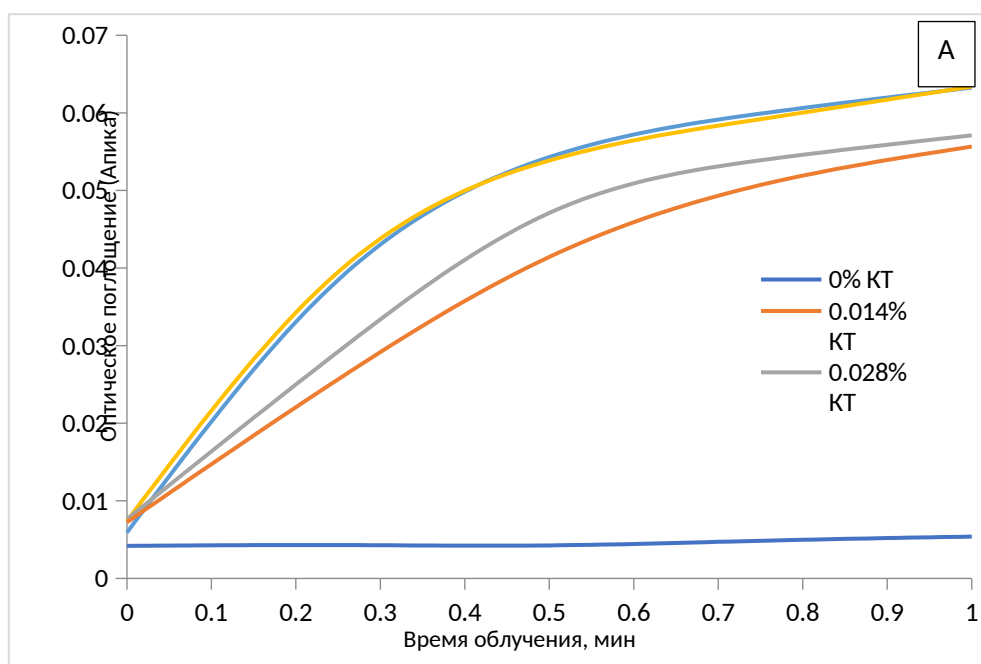


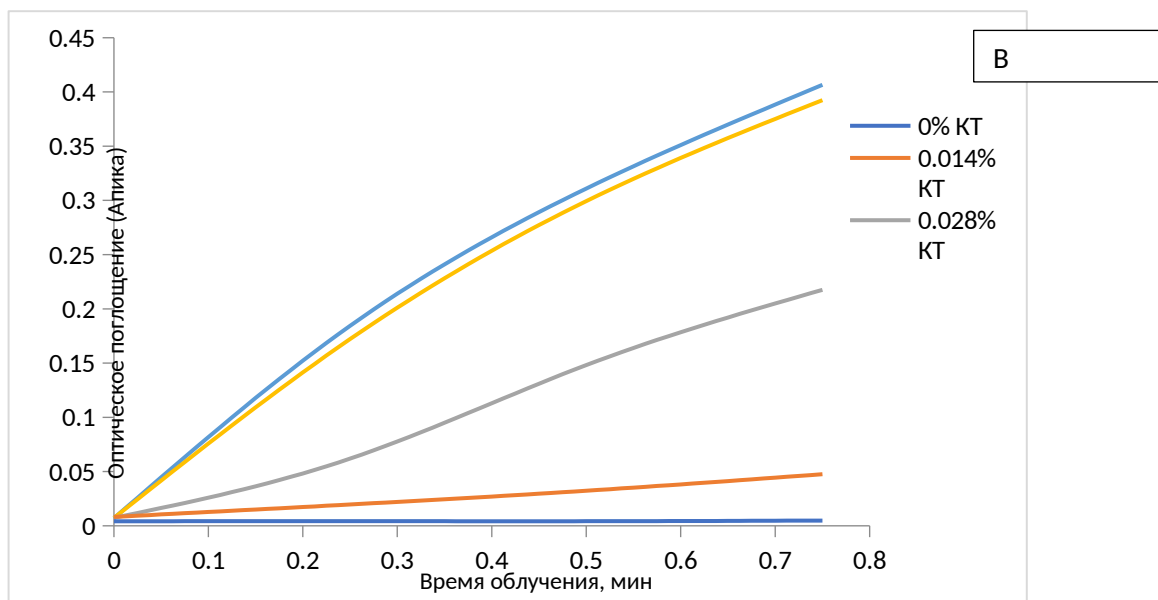
Рисунок 22 – Кинетика **окисления** КТ дигидрорадамина 6G при **pH 7.5. (А)** и **pH 11.5. (Б)**. Нормировка по оптической плотности КТ на длине волны облучения (450 нм), демонстрирующая зависимость генерации АФК от концентрации раствора и времени облучения

Из Рисунка 22 видно, что все типы КТ участвуют в окислительной реакции ДГРМ при изменении водородного показателя, что указывает на образование АФК с противоположной индикаций (выше было проведено восстановление CytC).

Аналогичным образом при pH 7,5 проводили исследования для различных массовых концентраций КТ, а именно 0,014%, 0,028%, 0,057% и 0,115% (Рисунок 23).

Для корректного сравнения начальных скоростей фотореакции (Рисунок 24), экспериментальные скорости восстановления нормировали на молярный коэффициент экстинкции родамина 6G на 530 нм (116000 1/см*М).





А – Ag(10%):InP/ZnS

Б – CdTe/Cd

В – InP/ZnSe/ZnS

Рисунок 23 – Кинетика окисления дигидрородамина 6G в зависимости от концентрации КТ различных типов при **pH 7.5**

Из Рисунка 23 видно, что измерение способности образования АФК происходит у всех типов исследуемых КТ и имеет тенденцию к стабильности при изменении концентрации раствора при стабильном буфере.

На Рисунке 24 представлены результаты данного сравнения.

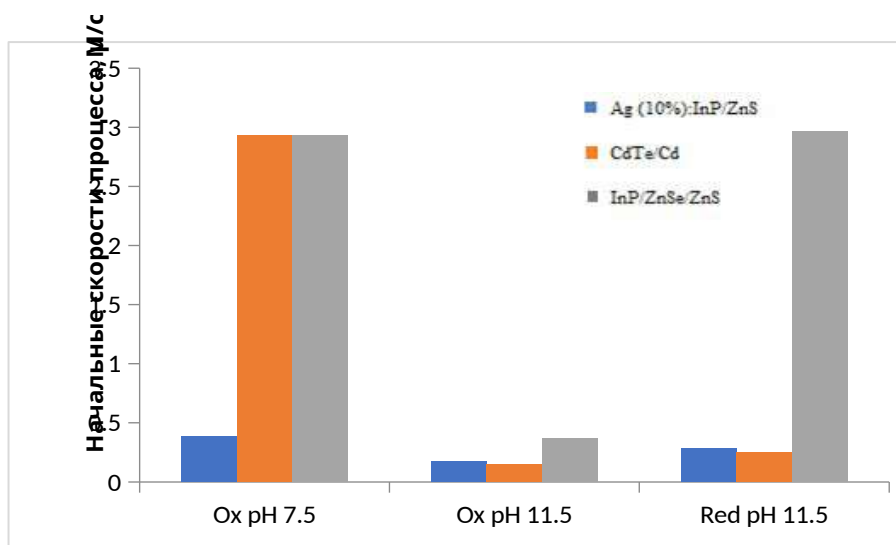


Рисунок 24 – Сравнение (нормированных по экстинкции красителя) начальных скоростей фотогенерации квантовыми точками АФК (Ox) и (Red)

Показано, что наибольшими скоростями генерации всех АФК обладают КТ InP/ZnSe/ZnS . Предположительно данный результат связан с фотофизическими свойствами ядра InP , которое при достаточной пассивации (были использованы InP/ZnSe/ZnS с относительно толстой ZnS оболочкой, более 3 нм) сульфидом цинка обладает наилучшим разделением заряда в возбужденном состоянии КТ и его передачей во внешнюю среду. Интересно, что скорость генерации восстановительных форм этими КТ многократно выше остальных.

Возможно, это связано с конкуренцией окислительных форм с окислением материала полупроводника этих КТ при pH 11,5, поскольку для остальных типов КТ разница в Ох/Red формах не столь значительна.

Квантовые точки Ag(10%):InP/ZnS в целом обладают на 92% тем же составом ядра, что и InP/ZnS , но существенно меньшей толщиной оболочки ZnS . Видимо поэтому, в данном случае, вероятность реакций АФК всех типов с их поверхностью крайне высока. По факту, при непродолжительном облучении они буквально растворяются (крайне низкая фотостабильность). Это, очевидно, приводит к снижению видимой скорости генерации АФК относительно недопированных InP/ZnSe/ZnS с толстой защитной оболочкой.

Аналогично, поведение кадмиевых КТ вписывается в данную теорию. Именно в этом случае окисление материала полупроводника затруднено (CdTe/Cd наиболее фотостабильные КТ), что дает высокую генерацию Ох. Их рекомбинация с Red снижает видимый квантовый выход последних.

Влияние pH также оказалось предсказуемым. Дело в том, что окислительный потенциал гидроксильного радикала заметно падает с повышением pH, что отмечалось ранее в литературе [126].

В исследовании также было проведено изучение кинетики генерации Ох с использованием различных массовых концентраций КТ. Показано, что выход на плато для индиевых КТ приходится на значение 0,06% масс. При этом для КТ CdTe/Cd увеличение генерации идет не менее чем до 0,115%. Данный результат опять же может объясняться склонностью к

восстановительным процессам InP/ZnSe/ZnS в темноте и в отсутствие кислорода.

Более того, выработка АФК стабильна на протяжении всего периода протекания окислительно-восстановительных реакций (Рисунки 25, 26).

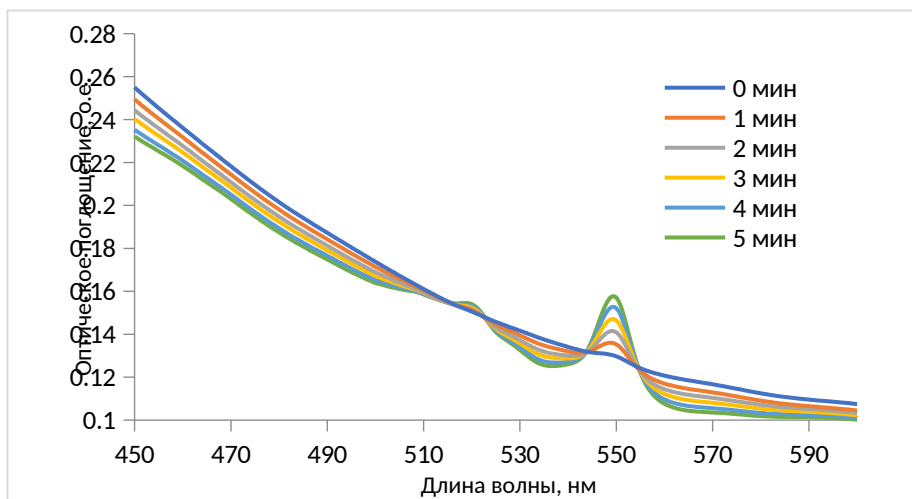


Рисунок 25 – Характерные изменения спектра CytC в процессе облучения совместно с дисперсией КТ (на примере Ag(10%):InP/ZnS). Генерация АФК идет весь период детекции по экспоненте (5 мин)

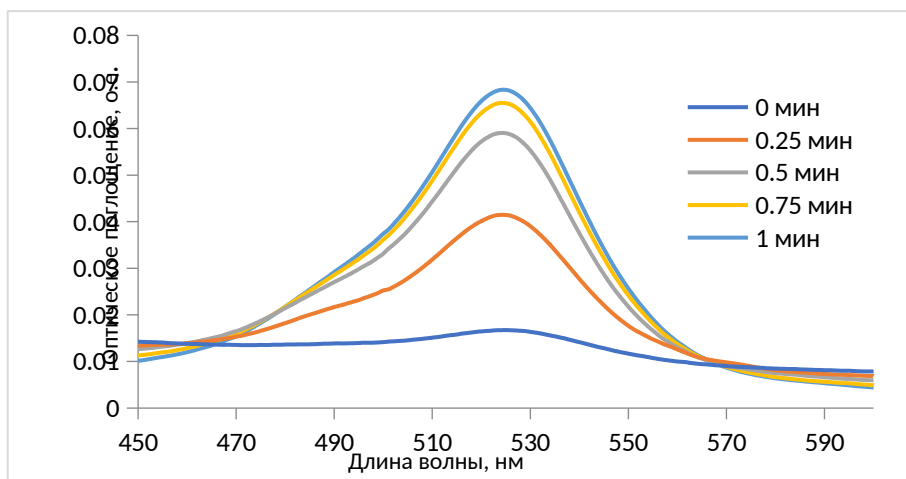


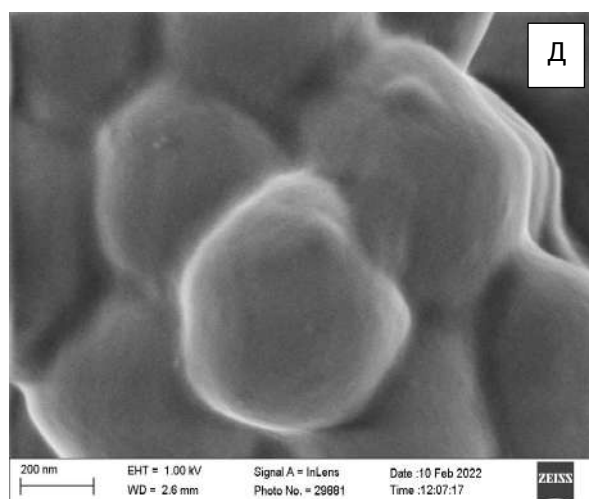
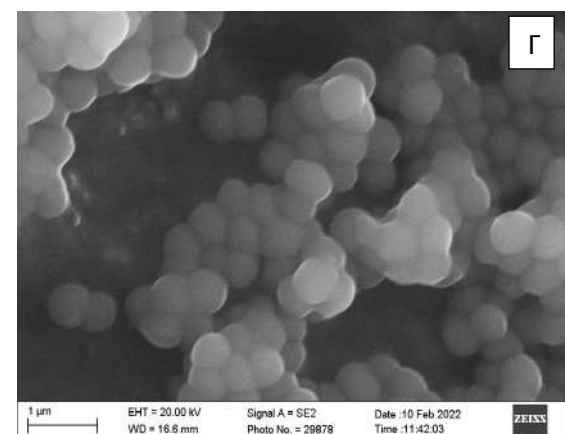
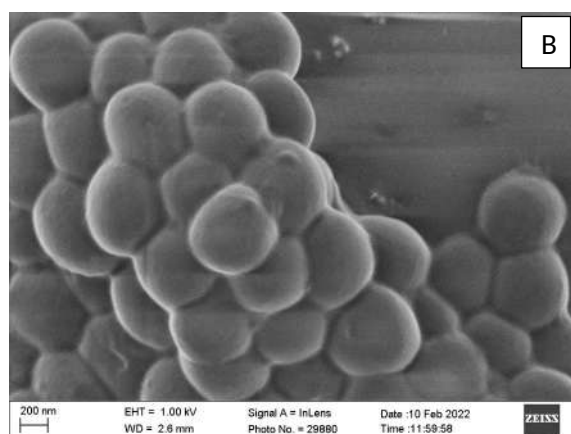
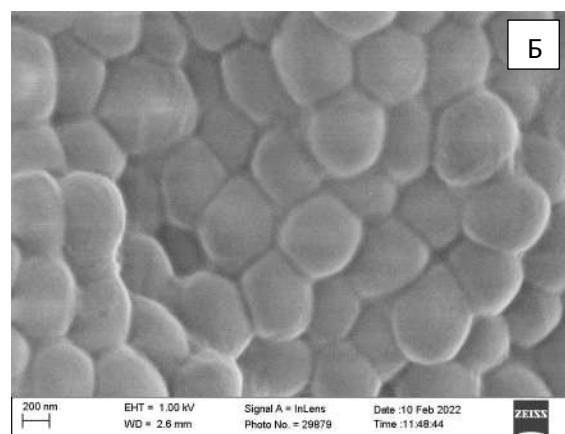
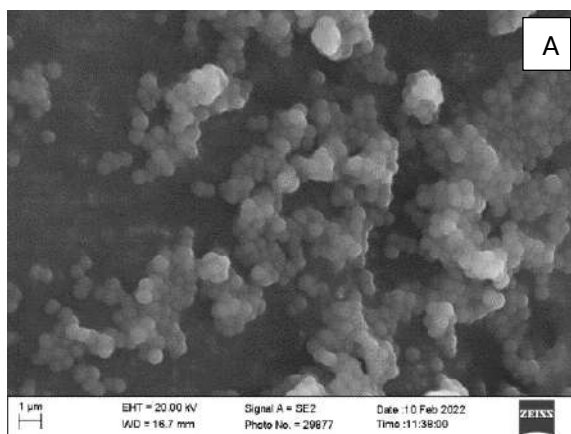
Рисунок 26 – Характерные изменения спектра ДГРМ в процессе облучения совместно с дисперсией КТ (на примере Ag(10%):InP/ZnS). Генерация АФК идет весь период детекции с отрицательной экспонентой (1 мин)

На основании проведенного исследовательского этапа, с точки зрения практикующего офтальмолога-клинициста, можно резюмировать, что все три типа исследуемых КТ способны к выработке АФК, что показано Ох и Red реакциями с использованием CytC и ДГРМ. 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).

4.3. Результаты исследования физического взаимодействия и фармакокинетики квантовых точек с бактериальной клеткой

Результаты сканирующей/растровой электронной микроскопии

На коллаже Рисунка 27 представлена культура МРЗС 0,5 по стандарту МакФарланда в увеличениях от 1 мкм до 200 нм. Видно, что колонии представляют собой гроздевидные («виноградные») скопления шарообразной формы, с ровными гладкими стенками, без признаков их повреждения.

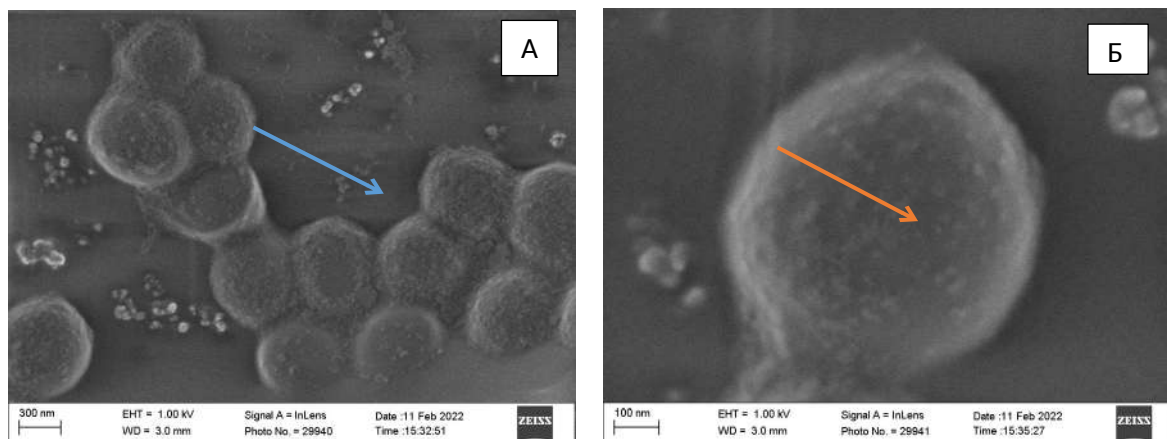


А-Д – различные участки поля зрения МРЗС при разном увеличении

Рисунок 27 – Растровая электронная микроскопия: изображения бактерий МРЗС, взятых непосредственно с кровяного агара, на углеродном скотче.

Увеличение x1 мкм – 200 нм

Сразу после смешивания колоний МРЗС и КТ (1 минута наблюдения) визуализируются процессы адгезии КТ к наружной поверхности культуры МРЗС, что выглядит как мелкоточечная дисперсионное напыление. Вероятнее всего данное явление можно объяснить электростатической природой, которое объясняется наличием дипольных моментов у исследуемых молекул (Рисунок 28).

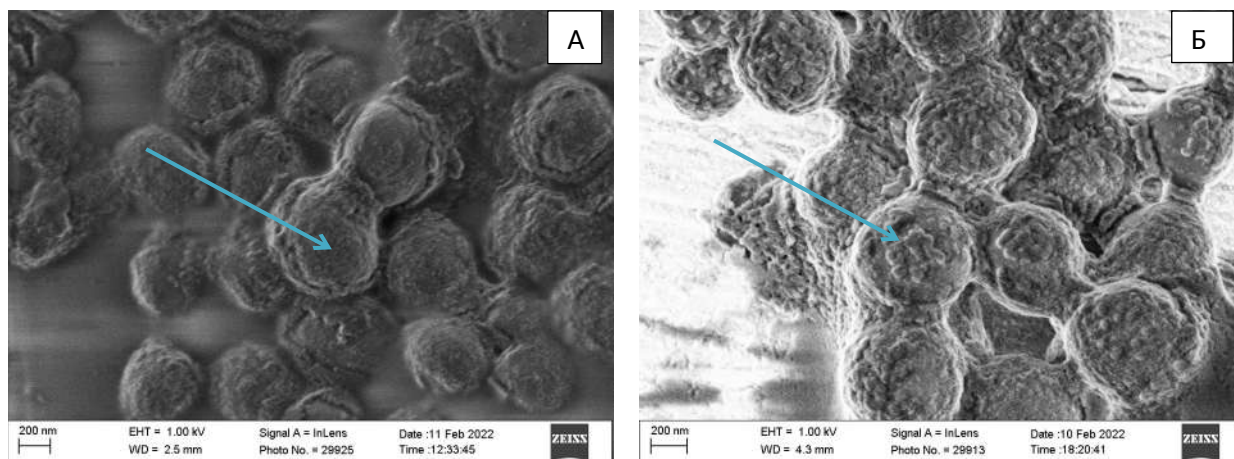


А, Б – бактерии МРЗС при взаимодействии с КТ

Рисунок 28 – Растровая электронная микроскопия: изображения бактерий МРЗС, взятых непосредственно с кровяного агара на углеродном скотче через 1 минуту после смешивания с раствором КТ (бактерии обозначены оранжевой стрелкой, КТ на их поверхности – синей стрелкой).

Увеличение x100-300 нм

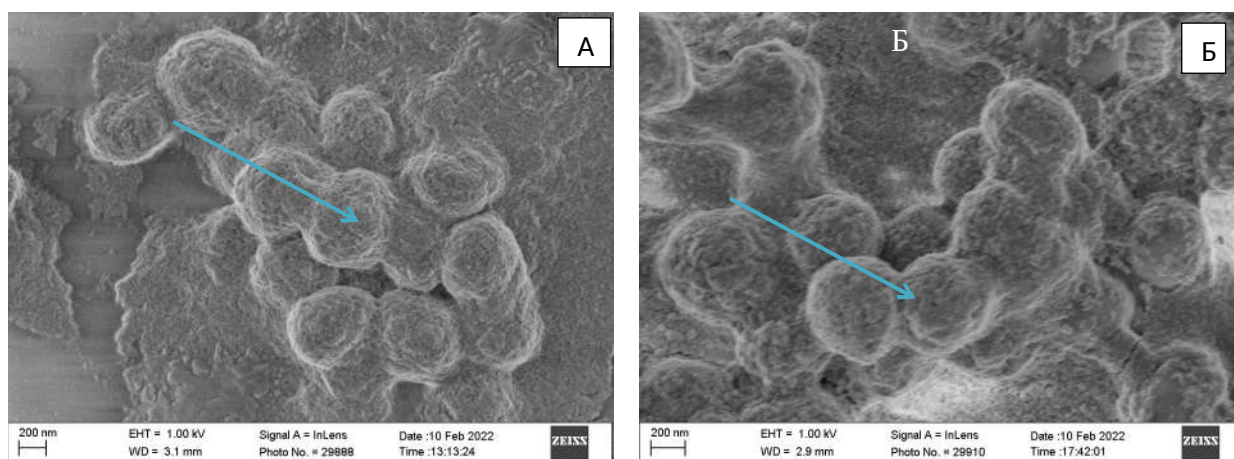
Через 5 минут наблюдения визуализируется увеличение дисперсии КТ в объеме, что выглядит как сливные объемные конгломераты на поверхности бактериальных клеток. Данное визуальное явление можно объяснить началом прохождения КТ через клеточную мембрану бактериальной клетки (Рисунок 29).



А, Б – бактерии МРЗС при взаимодействии с КТ

Рисунок 29 – Растровая электронная микроскопия: изображения бактерий МРЗС, взятых непосредственно с кровяного агара на углеродном скотче через 5 минут после смешивания с раствором КТ (конгломераты КТ на поверхности обозначены синей стрелкой). Увеличение x200 нм

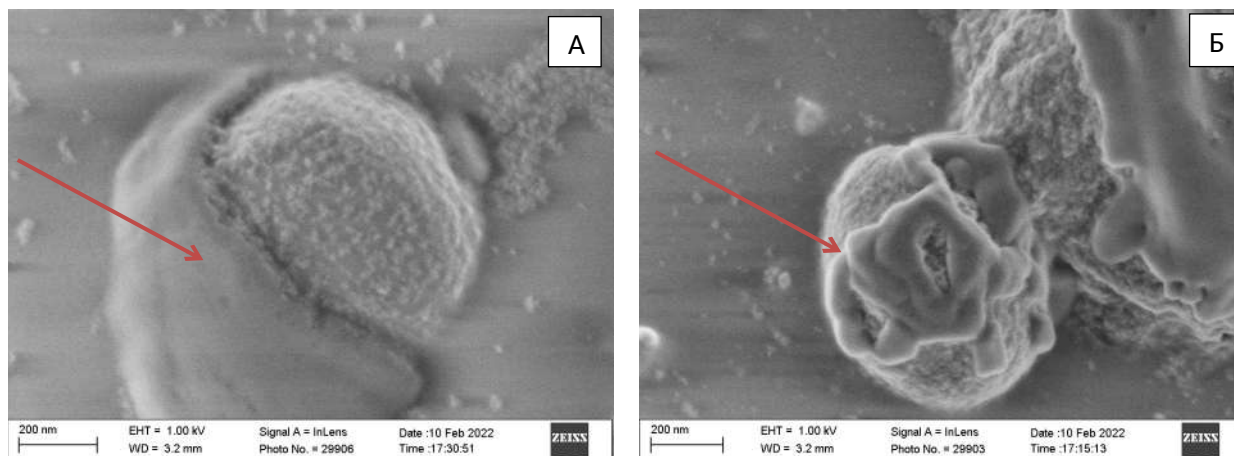
Через 10 минут наблюдения, объем дисперсии КТ на поверхности бактериальных клеток продолжал увеличиваться, местами визуализировались очаги их сливного накопления (Рисунок 30). Фактически, вся поверхность бактериальных клеток была имbibирована слоем КТ.



А, Б – бактерии МРЗС при взаимодействии с КТ

Рисунок 30 – РЭМ изображения бактерий МРЗС, взятых непосредственно с кровяного агара на углеродном скотче через 10 минут после смешивания с раствором КТ (очаги сливного накопления КТ на поверхности обозначены синей стрелкой). Увеличение x200 нм

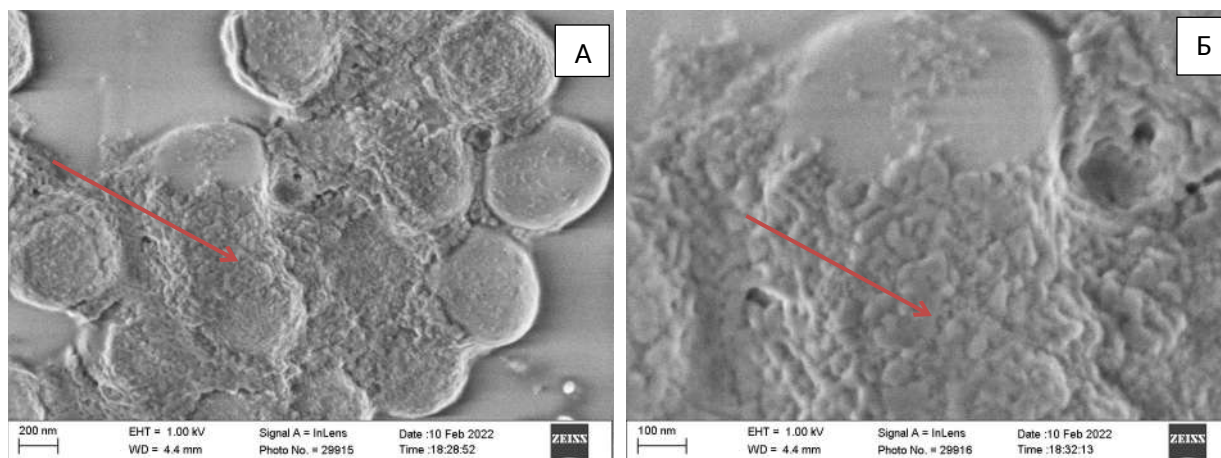
Через 30 минут наблюдения начали визуализироваться первые признаки выхода содержимого из бактериальных клеток (Рисунок 31).



А, Б – бактерии МРЗС при взаимодействии с КТ

Рисунок 31 – Растровая электронная микроскопия: изображения бактерий МРЗС, взятых непосредственно с кровяного агара на углеродном скотче через 30 минут после смешивания с раствором КТ (очаги разрушения бактериальных клеток обозначены красной стрелкой). Увеличение x200 нм

При этом часть клеток находилась в состоянии диффузной инфильтрации КТ (Рисунок 32).



А, Б – бактерии МРЗС при взаимодействии с КТ

Рисунок 32 – Растровая электронная микроскопия: изображения бактерий МРЗС, взятых непосредственно с кровяного агара на углеродном скотче через 30 минут после смешивания с раствором КТ (очаги диффузной инфильтрации бактериальных клеток обозначены красной стрелкой).

Увеличение x100-200 нм

Через 60 и 120 минут наблюдения за процессами взаимодействия культуры МРЗС и КТ значительных отличий не визуализировалось. Во всех полях наблюдения была выявлена различная стадийность процесса разрушения бактериальных клеток от процесса набухания (Рисунок 33) до процессов полного разрушения с выходом содержимого в межклеточное пространство (Рисунок 34).

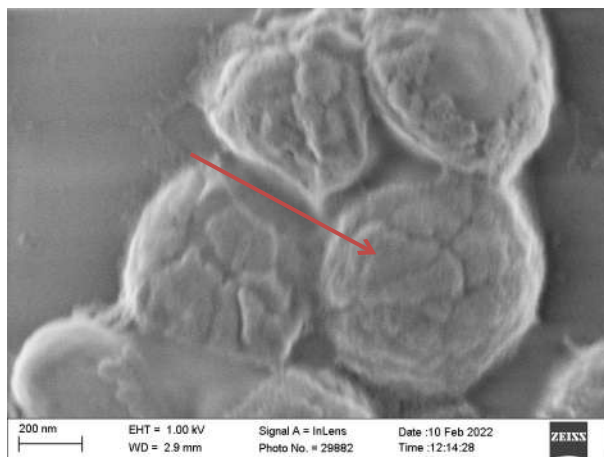
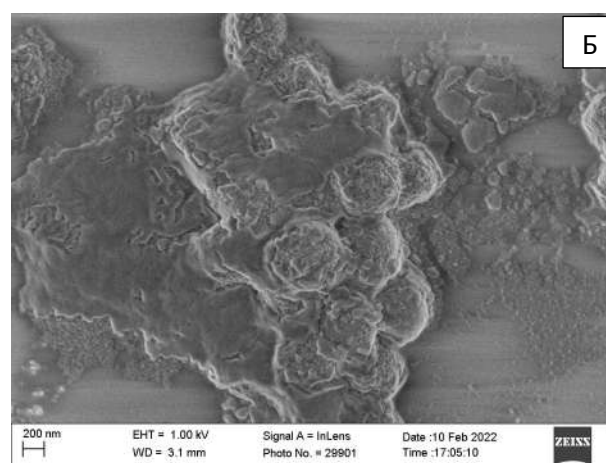
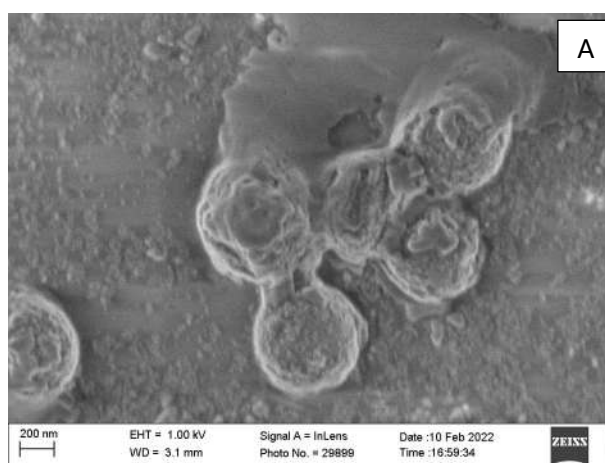
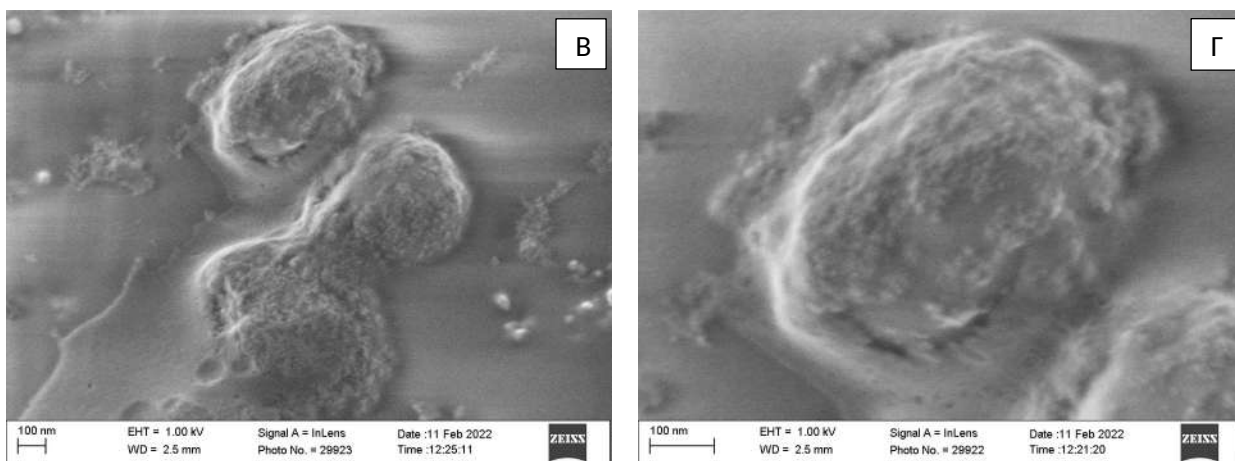


Рисунок 33 – Растровая электронная микроскопия: изображения бактерий МРЗС, взятых непосредственно с кровяного агара на углеродном скотче через 60 минут после смешивания с раствором КТ (процесс набухания бактериальной клетки с частичным выходом содержимого в межклеточное пространство – красная стрелка). Увеличение x200 нм





А-Г – различные стадии разрушения бактериальных клеток с выходом содержимого в межклеточное пространство

Рисунок 34 – Растровая электронная микроскопия: изображения бактерий МРЗС, взятых непосредственно с кровяного агара на углеродном скотче через 120 минут после смешивания с раствором КТ. Увеличение x100-200 нм

В результате, на основании анализа изображений, полученных в ходе динамического наблюдения за взаимодействием культуры МРЗС с КТ посредством растровой электронной микроскопии, можно сделать заключение, что этапы адгезии КТ на поверхности бактериальной клетки начинаются через 5 минут после их взаимодействия; в последующем КТ формируют сливные зоны в различных участках бактериальной клетки; первые признаки разрушения бактериальной клетки с выходом ее содержимого начинают визуализироваться через 30 минут наблюдения; последующая динамика разрушения сопровождается генерализованным выходом содержимого бактериальных клеток, изменением их формы и объема в течение 60-120 минут.

На основании данных наблюдений стартом антиинфекционной активности КТ в отношении патогенной микрофлоры можно рассматривать временной промежуток от 30 до 60 минут, к 120 минутам наблюдения практически все бактериальные клетки, находящиеся в зоне наблюдения, являются полностью или частично разрушенными.

Для понимания процессов, происходящих непосредственно внутри бактериальной клетки, оценки особенностей фармакокинетики при вероятном прохождении КТ через клеточную мембрану МРЗС, и для изучения механизмов, лежащих в основе разрушения бактерии, необходимо провести исследования посредством просвечивающей электронной микроскопии, позволяющие визуализировать клеточные элементы в состоянии сверхвысокого разрешения (200-500 нм).

Результаты просвечивающей электронной микроскопии

На Рисунках 35, 36 представлена клетка МРЗС, сразу после смешивания с раствором КТ (1 минута наблюдения). На микрофотографии видно, что КТ представляют собой мелкоточечные гиперрефлективные объекты диаметром 5-10 нм (обозначены синими стрелками) в непосредственной близости от клеток МРЗС (обозначены красными стрелками). Часть КТ, находясь в непосредственной близости от клеточной мембраны, организуется в конгломерат (вероятно, за счет вышеописанных сил электростатического взаимодействия). Единичные КТ визуализируются во внутренних структурах бактериальных клеток (обозначено зеленой стрелкой).

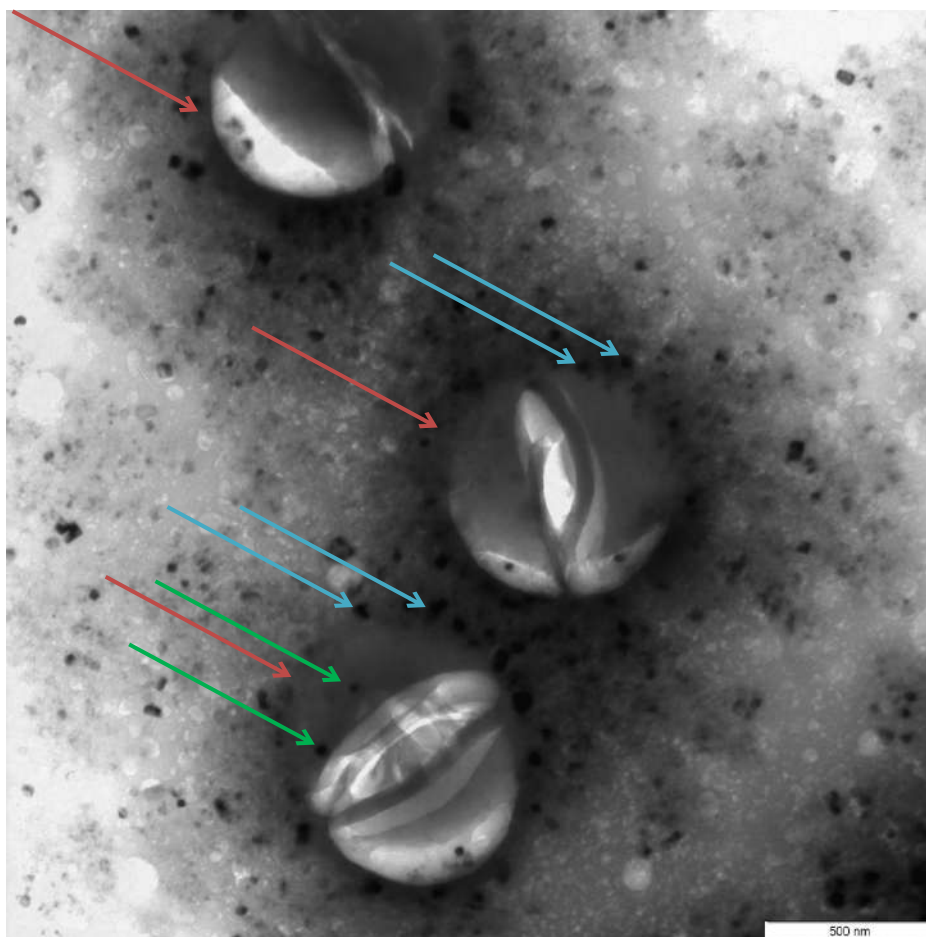


Рисунок 35 – Просвечивающая электронная микроскопия: изображения бактерий МРЗС, взятых непосредственно с кровяного агара на углеродной пленке через 1 минуту после смешивания с раствором КТ (КТ на поверхности обозначены синей стрелкой, бактерии – красными стрелками, КТ внутри клеток – зеленой стрелкой). Увеличение x500 нм

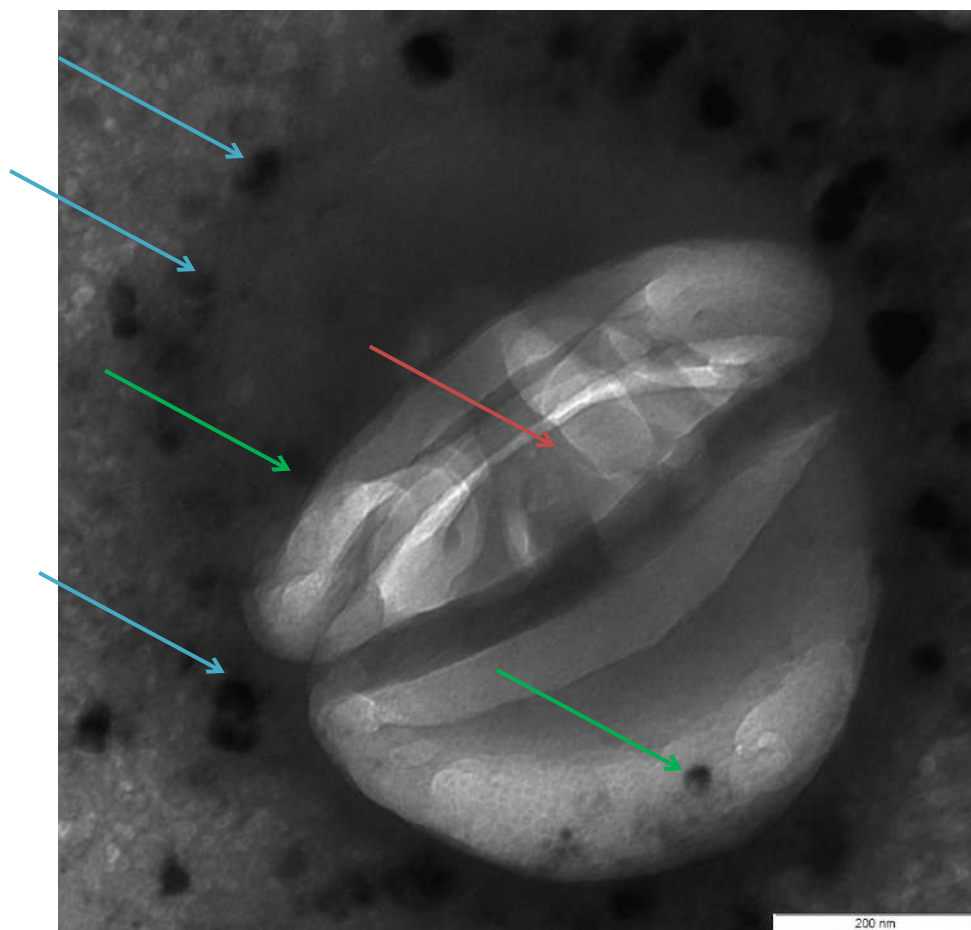


Рисунок 36 – Просвечивающая электронная микроскопия: изображение бактерии МРЗС, взятой непосредственно с кровяного агара на углеродной пленке через 1 минуту после смешивания с раствором КТ (КТ на поверхности обозначены синей стрелкой, бактерия с ядерным аппаратом – красной стрелкой, КТ внутри клетки – зелеными стрелками). Увеличение x200 нм

Через 5 минут наблюдения, количество КТ, находящихся в непосредственной близости от клеточной мембраны, а также проникающих во внутренние структуры МРЗС, увеличивается (Рисунок 37). При этом начинает визуализироваться исчерченность клеточной мембраны МРЗС, которая рассматривается как мембранный канал, являющийся входом для КТ (обозначено оранжевой стрелкой).

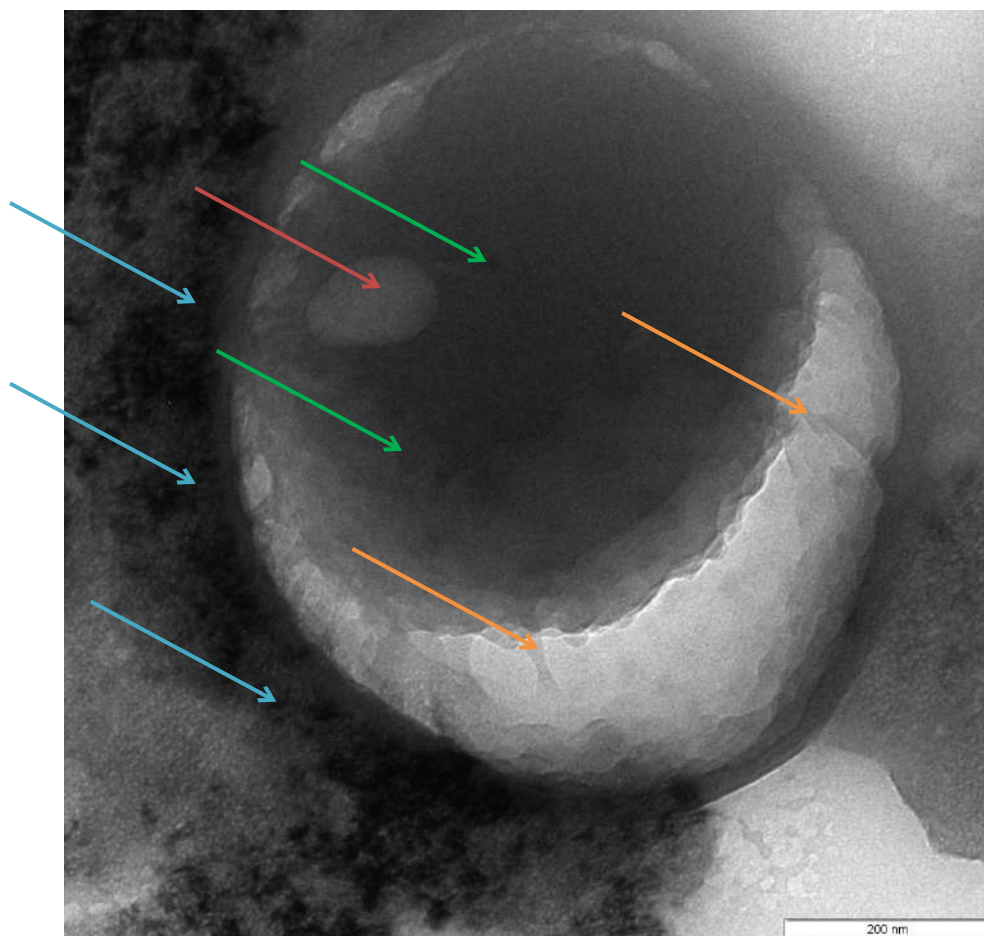


Рисунок 37 – Просвечивающая электронная микроскопия: изображение бактерии МРЗС, взятой непосредственно с кровяного агар на углеродной пленке через 5 минут после смешивания с раствором КТ (сливные группы КТ на поверхности обозначены синей стрелкой, бактерия с ядерным аппаратом – красной стрелкой, КТ внутри клетки – зелеными стрелками, мембранный канал – оранжевая стрелка). Увеличение x200 нм

Через 10 минут наблюдения визуализируется большое количество клеток, в центральной части которых обнаруживаются группы КТ (Рисунок 38). При этом наблюдается диффузная исчерченность клеточной мембраны. На микрофотографии представлено смещение клеточного ядра (оранжевая стрелка) к клеточной периферии, с частичным выходом за пределы клеточной мембраны.

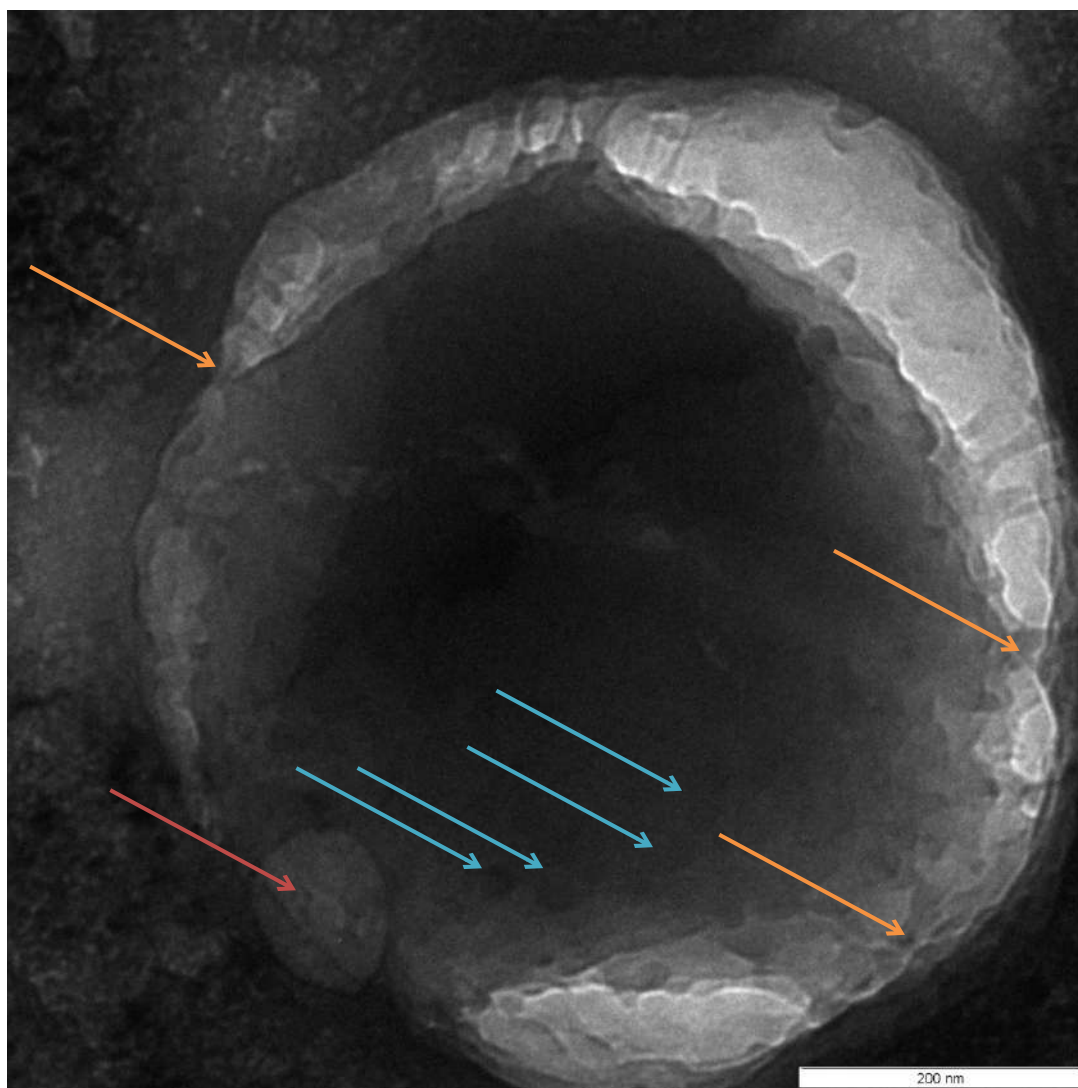


Рисунок 38 – Просвечивающая электронная микроскопия: изображение бактерии MR3C, взятой непосредственно с кровяного агара на углеродной пленке через 10 минут после смешивания с раствором КТ (сливные группы КТ внутри клетки обозначены синей стрелкой, бактерия с ядерным аппаратом, смещенным к периферии – красной стрелкой, диффузные мембранные каналы с признаками разрушения клеточной стенки – оранжевые стрелки). Увеличение x200 нм

Через 30-60 минут наблюдения в проекции взора начинают выявляться клетки с признаками необратимого разрушения: деформация, разрушение клеточной мембраны, выход содержимого в межклеточное пространство (Рисунки 39, 40).

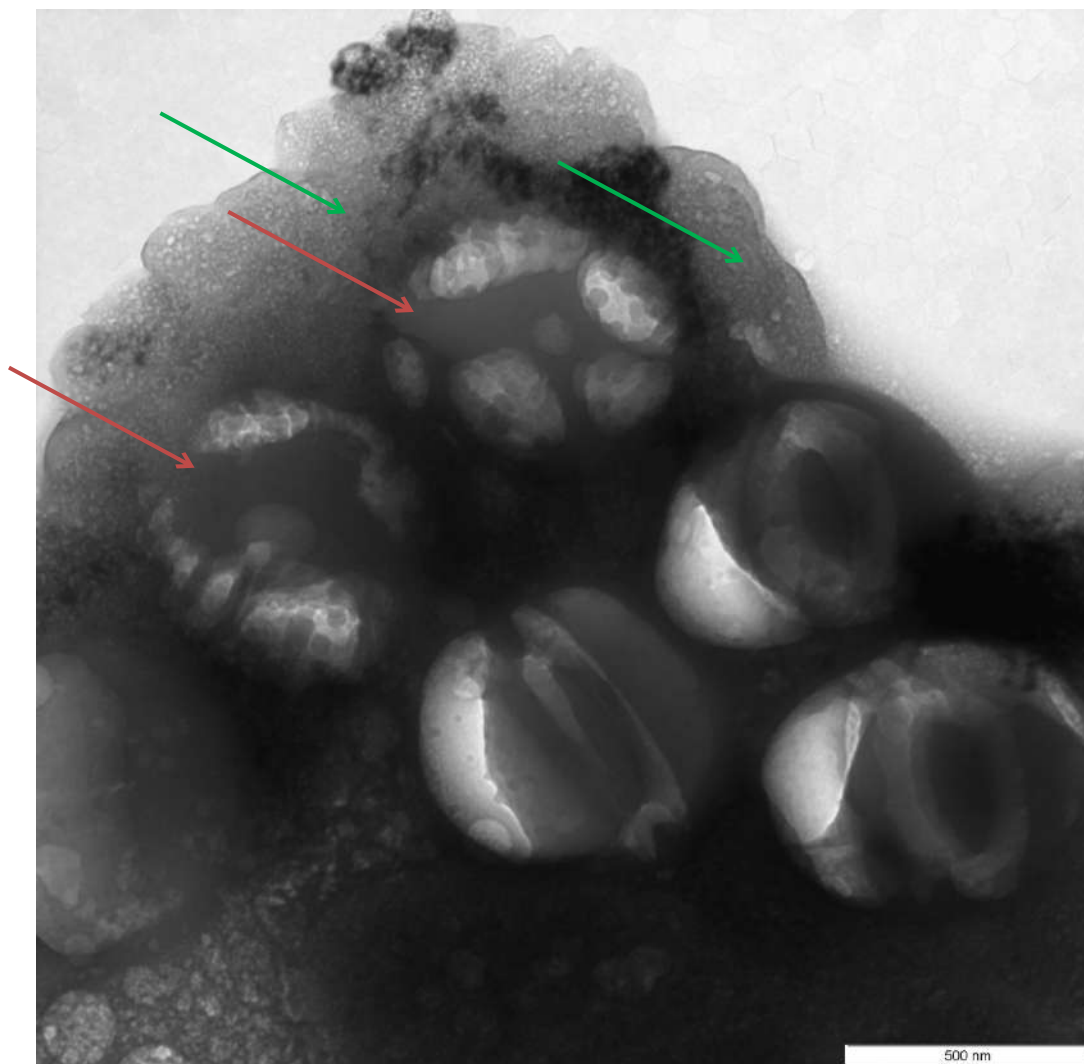


Рисунок 39 – Просвечивающая электронная микроскопия: изображения бактерий МРЗС, взятых непосредственно с кровяного агара на углеродной пленке через 30 минут после смешивания с раствором КТ (деформация клеток, выход содержимого в межклеточное пространство – зелёная стрелка, разрушение клеточной мембраны – красная стрелка). Увеличение x500 нм

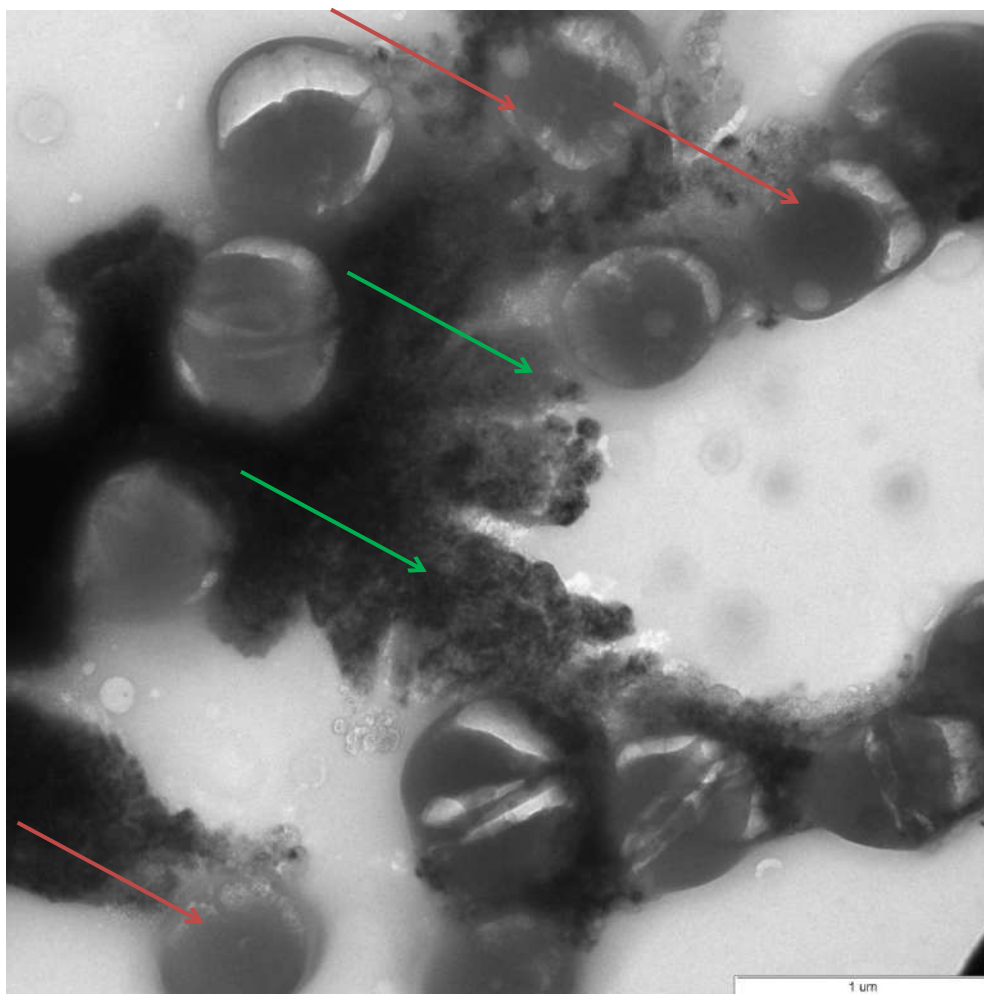


Рисунок 40 – Просвечивающая электронная микроскопия: изображения бактерий МРЗС, взятых непосредственно с кровяного агара на углеродной пленке через 60 минут после смешивания с раствором КТ (деформация клеток, выход содержимого в межклеточное пространство – зелёная стрелка, разрушение клеточной мембраны – красная стрелка). Увеличение $\times 1$ мкм

На протяжении наблюдения в течение 120 минут клетки, находящиеся в поле зрения, демонстрируют картину разрушения клеточной мембраны, с выходом содержимого в межклеточное пространство (Рисунки 41-43).

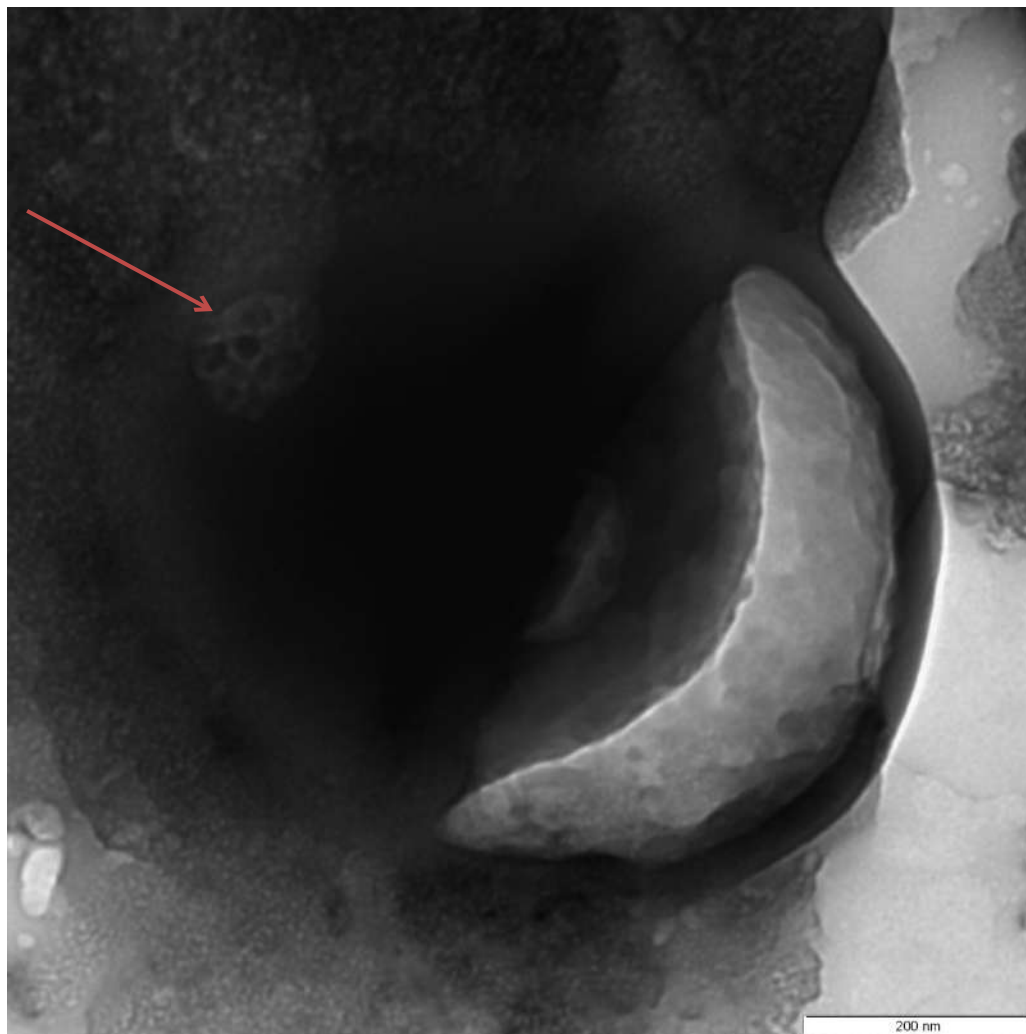


Рисунок 41 – Просвечивающая электронная микроскопия: изображение бактерии МРЗС, взятой непосредственно с кровяного агар на углеродной пленке через 120 минут после смешивания с раствором КТ (деформация клетки, выход содержимого в межклеточное пространство, границы клетки не просматриваются, ядерный аппарат диффузно имbibирован КТ – красная стрелка). Увеличение x200 нм

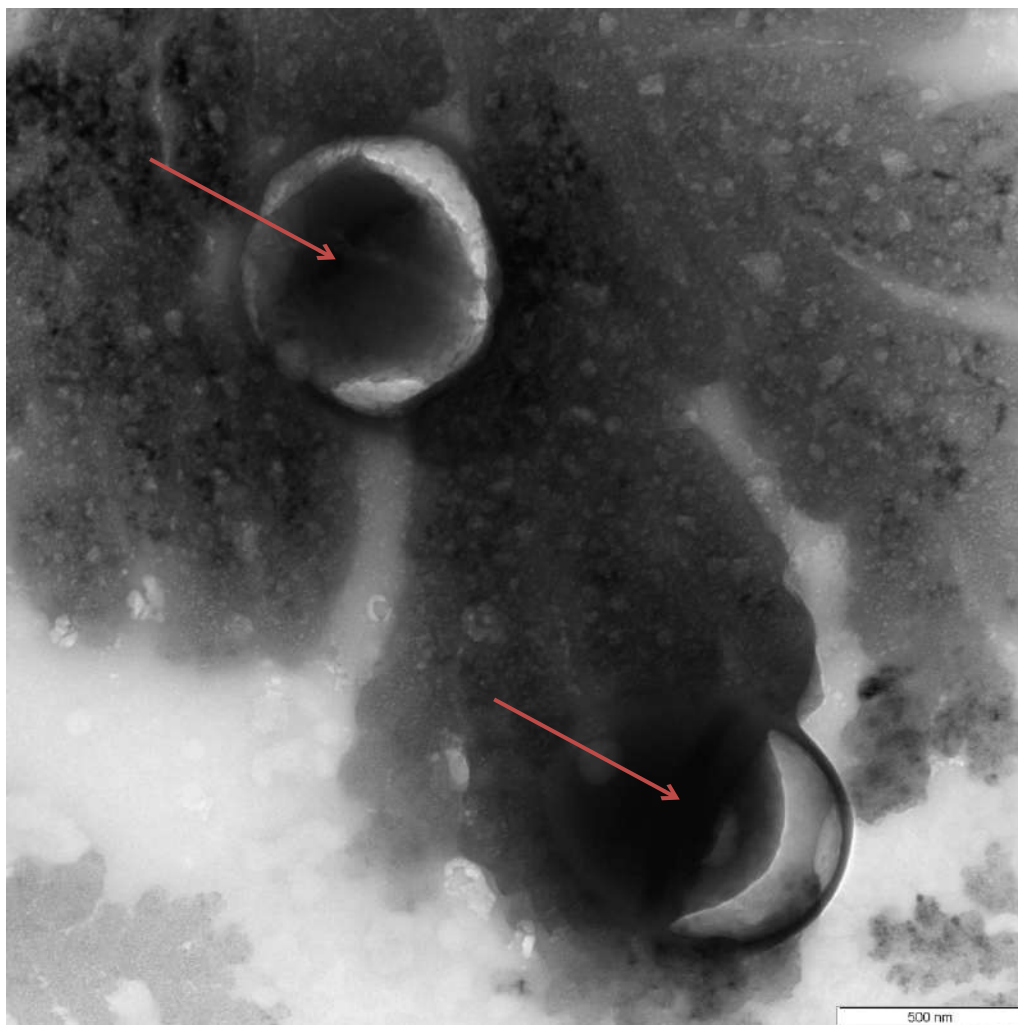


Рисунок 42 – Просвечивающая электронная микроскопия: изображения бактерий МРЗС, взятых непосредственно с кровяного агар на углеродной пленке через 120 минут после смешивания с раствором КТ. На микрофотографии (красные стрелки) представлены клетки с частичным разрушением клеточной мембраны – вверху; с полным разрушением и выходом содержимого в межклеточное пространство – внизу.

Увеличение x500 нм

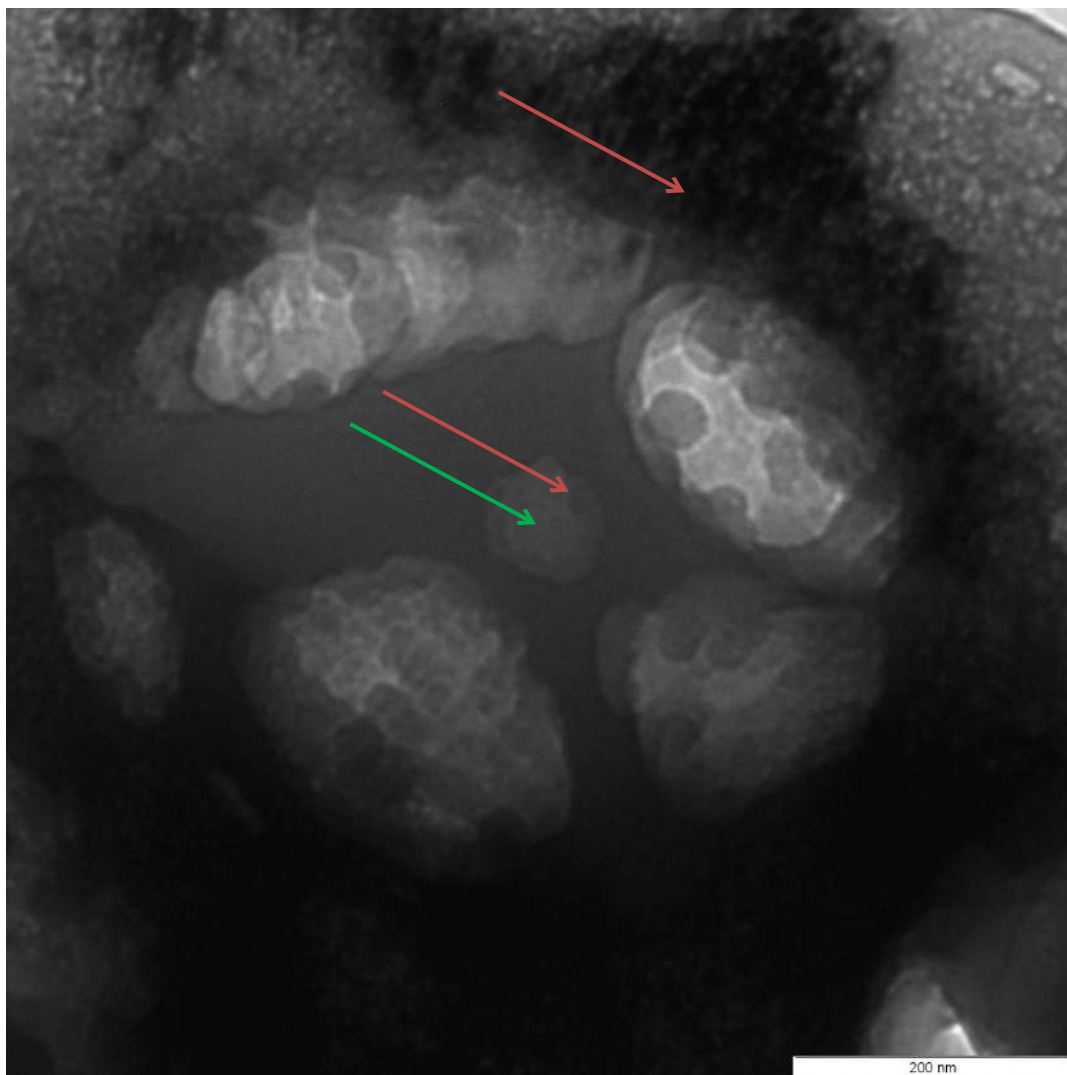


Рисунок 43 – Просвечивающая электронная микроскопия: изображение бактерии МРЗС, взятой непосредственно с кровяного агара на углеродной пленке через 120 минут после смешивания с раствором КТ. На микрофотографии представлено полное разрушение клетки с выходом содержимого в межклеточное пространство. Ядро продолжает находиться в центре клетки (зеленая стрелка), КТ располагаются диффузно за клеточной стенкой и в области ядерного аппарата (красная стрелка).

Увеличение x200 нм

На основании анализа изображений, полученных в ходе динамического наблюдения за взаимодействием культуры МРЗС с КТ посредством просвечивающей электронной микроскопии, можно сделать заключение, что данные по фармакокинетике процесса коррелируют с данными, полученными в результате проведения растровой электронной микроскопии. 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 растровой электронной микроскопии.

На основании проведенного исследования с использованием растровой и просвечивающей электронной микроскопии можно сделать вывод, что КТ обладают потенциалом к проникновению непосредственно во внутриклеточное пространство через сформированные мембранные каналы. Механизмы, происходящие в бактериальной клетке после проникновения КТ, сопровождаются полным её разрушением, физико-химической основой которого предположительно являются процессы образования АФК посредством химической активности КТ.

4.4. Синтез и исследование конъюгатов на основе квантовых точек и антибиотиков, используемых в офтальмологической практике

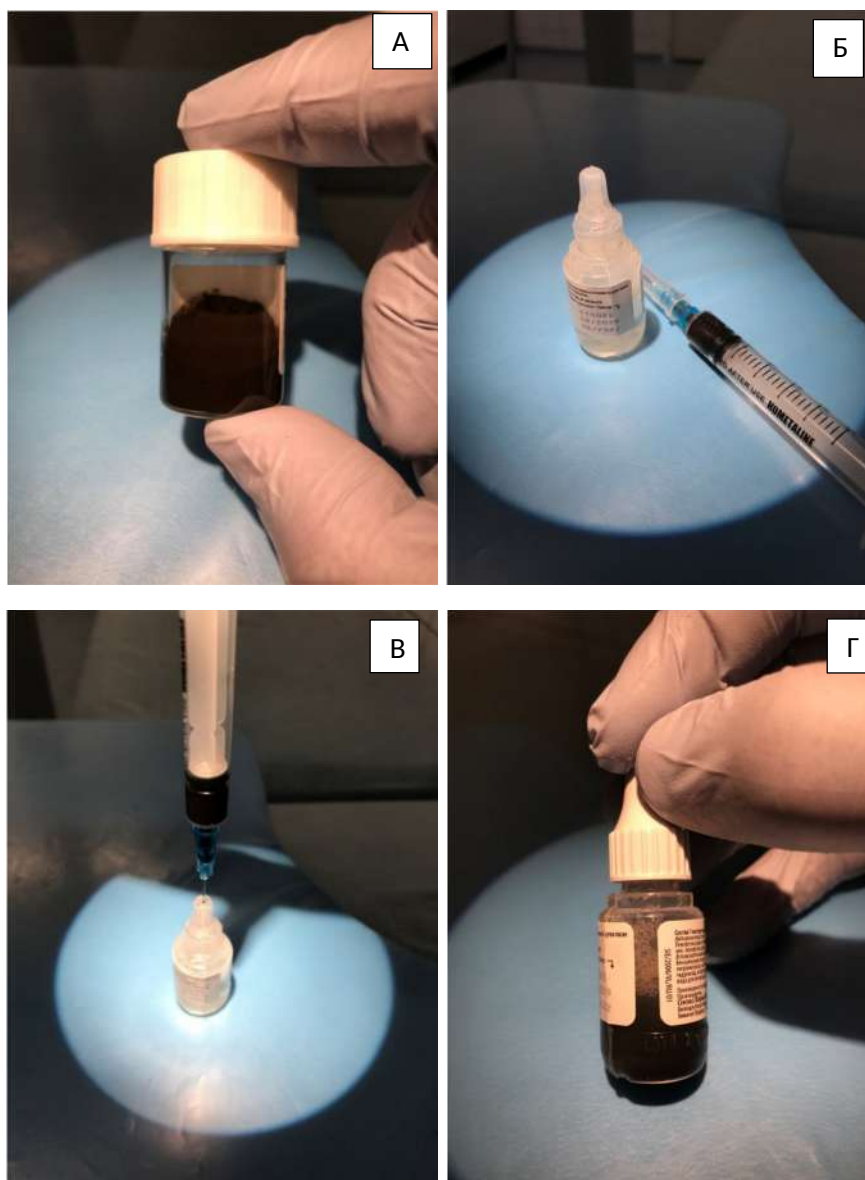
В тексте описания исследования КТ типа InP/ZnSe/ZnS , обозначаются буквой (а), в свою очередь КТ типа CdTe/Cd – буквой (б). Схема разведения – общая для обоих типов КТ.

Подготовка конъюгатов КТ типа InP/ZnSe/ZnS для заднего отрезка глаза

Исходно был взят нативный 10% масс. раствор InP/ZnSe/ZnS КТ в объеме 0,1 мл (раствор КТ1а), которые были разведены с помощью аналитической мерной пипетки сбалансированным солевым раствором (ССР) до концентраций 0,1% масс. (100-кратное разведение, раствор КТ2а), 0,01% масс. (1000-кратное разведение, раствор КТ3а). Стандартные разведения лиофилизатов Ванкомицина 1000 мг и Цефтазидима 1000 мг довели с помощью ССР до дозировок для интраокулярного введения, равных 1 мг/0,1 мл Ванкомицина (раствор В) и 2,25 мг/0,1 мл Цефтазидима (раствор Ц). Далее производили смешивание КТ3 с В (раствор КТ3а/В) и Ц (раствор КТ3а/Ц) в равных объемных соотношениях. На завершающем этапе выполняли центрифугирование полученных растворов на протяжении 3 мин в препаративной ультрацентрифуге при температуре 37 °С.

Подготовка конъюгатов КТ типа InP/ZnSe/ZnS и CdTe/Cd для переднего отрезка глаза

Раствор Левофлоксацина 5 мл для эпibuльбарного применения (далее Л) и конъюгат на основе КТ CdTe/Cd МРА 710 и Левофлоксацина (далее КТ/Л). Методика подготовки раствора КТ/Л заключалась в добавлении к 5 мл нативного раствора Левофлоксацина раствора КТ CdTe/Cd МРА 710 в объеме 1 мл/0,05% (для получения концентрации 0,01%). На завершающем этапе выполняли механическое перемешивание полученной суспензии на лабораторном шейкере (Рисунок 44).



А – раствор КТ

Б – раствор АБ

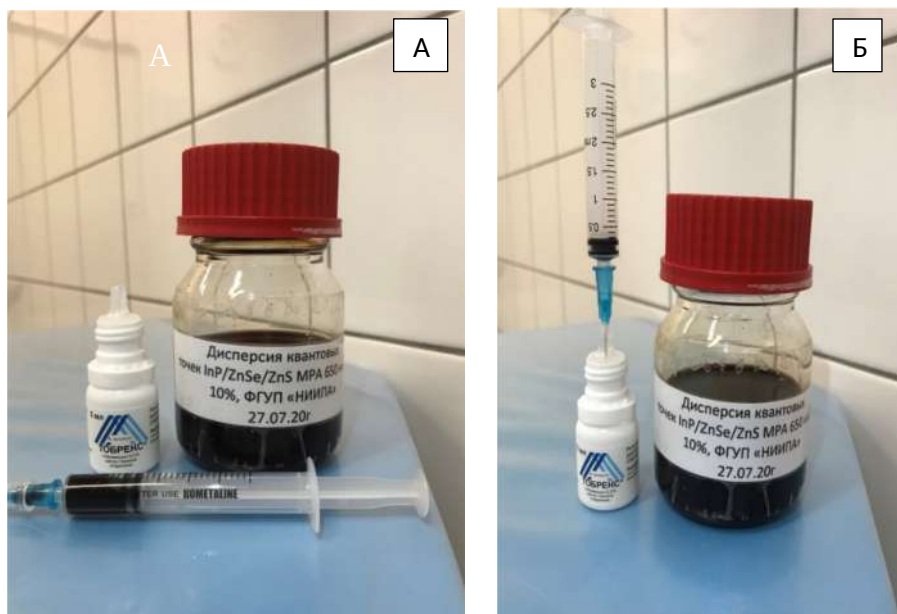
В – внесение 1 мл/0,05% раствора КТ в раствор АБ

Г – полученный конъюгат после взбалтывания

Рисунок 44 – Процесс приготовления конъюгата на основе КТ и
Левифлоксацина

Процесс приготовления комплекса с Тобрамицином стандартно заключался в добавлении к 5 мл нативного раствора Тобрамицина раствора КТ InP/ZnSe/ZnS 650 в объеме 0,05%/1 мл (для получения концентрации 0,01%) – раствор КТ/Т. На завершающем этапе стандартно выполняли механическое

перемешивание полученной суспензии на лабораторном шейкере (Рисунок 45).



А – 1 мл/0,05% раствора КТ и АБ тобрамицин

Б – раствор АБ после внесения КТ (КТ/Т)

Рисунок 45 – Процесс внесения раствора КТ в капли для эпibuльбарной инстилляции

Оптические и люминесцентные свойства КТ InP/ZnSe/ZnS и их конъюгатов для заднего отрезка глаза (Ванкомицин и Цефтазидим)

На Рисунке 46 изображены спектры флуоресценции раствора КТ1а (в нативной концентрации 10%) при возбуждении в видимой области спектра, нормированные на свою максимальную интенсивность. Видно, что при изменении длины волны возбуждения от 400 до 550 нм положение максимума ФЛ смещается от 659 до 667 нм, а полуширина остается постоянной (80 ± 1 нм). Представленные результаты свидетельствуют о процессах фотовозбуждения исследуемых КТ в видимом спектральном диапазоне.

С практической точки зрения это говорит о том, что изменение длины волны возбуждения демонстрирует физическую и химическую активность 10% раствора КТ с одновременным заключением об адекватной паспортизации.

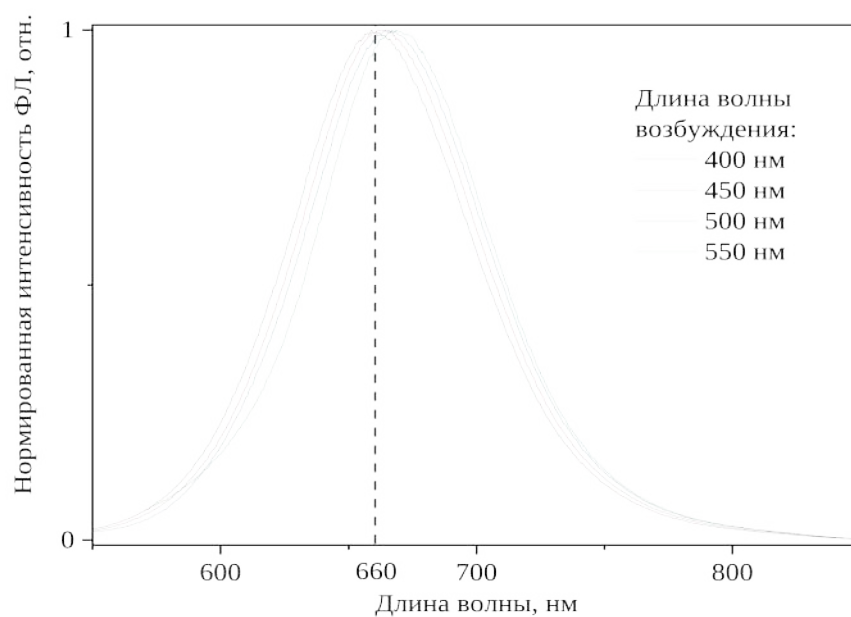
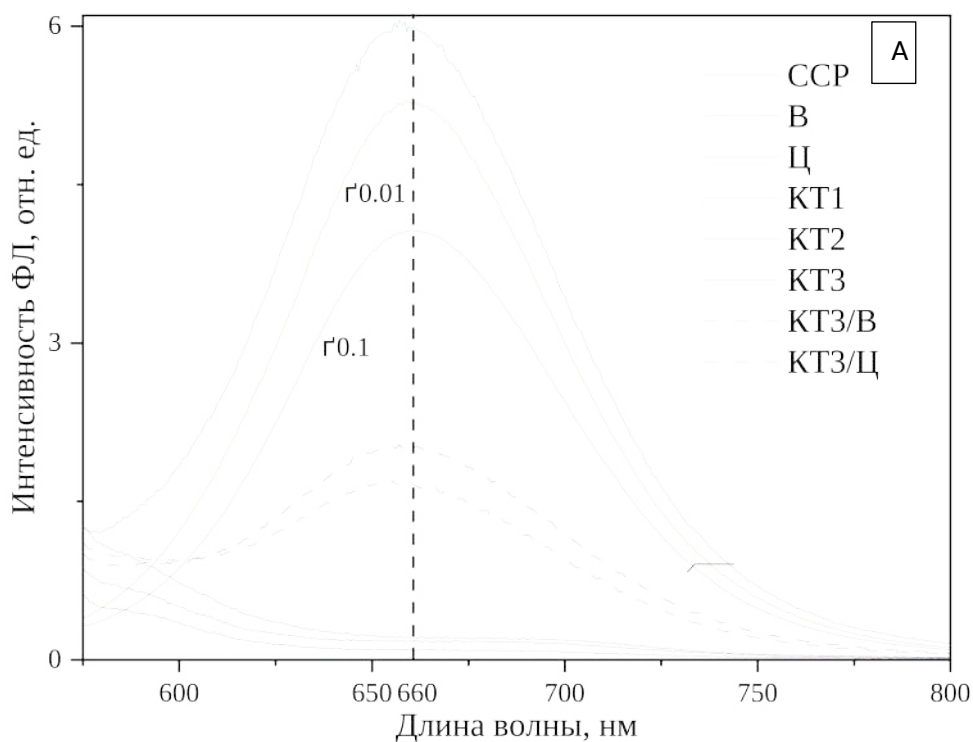


Рисунок 46 – Нормированные спектры флуоресценции раствора КТ1а (10%) при различных длинах волн возбуждения

На Рисунке 47 представлены спектры флуоресценции и оптической плотности исследуемых растворов и их конъюгатов.



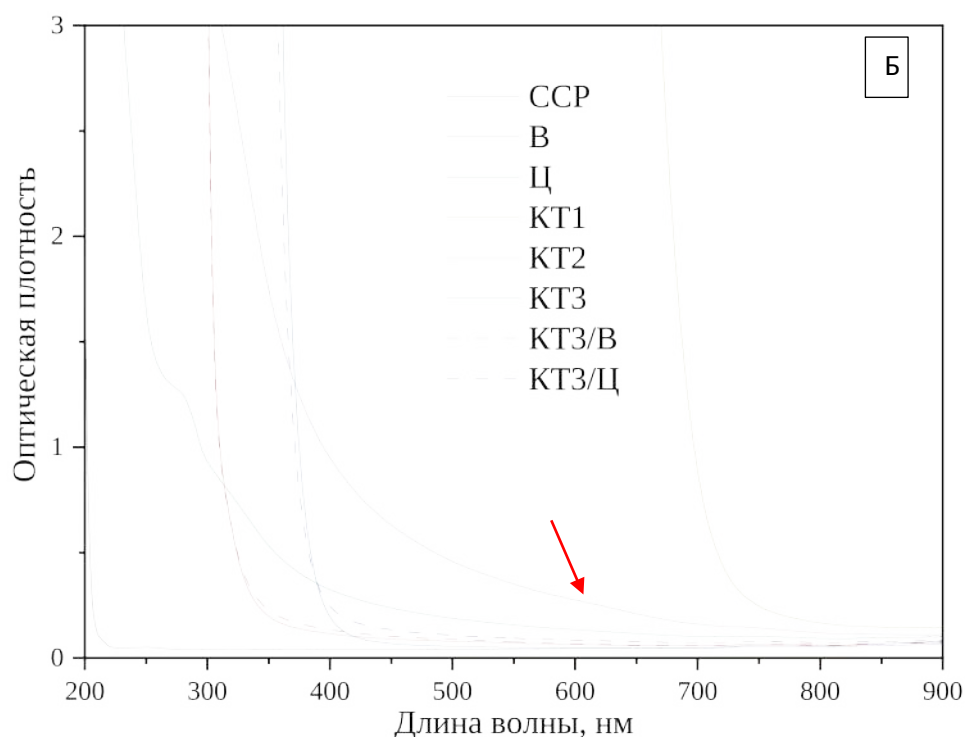


Рисунок 47 – Спектры флуоресценции (А) и оптической плотности (Б) исследуемых растворов КТ InP/ZnSe/ZnS и их конъюгатов

Из Рисунка 47А видно, что для растворов КТ1а–КТ3а (10%, 0,1%, 0,01% растворы) и их конъюгатов КТ3а/В и КТ3а/Ц наблюдается полоса флуоресценции с максимумом в области 660 нм, при этом ее интенсивность уменьшается при их разбавлении ССР и растворами антибиотиков соответственно. Для растворов ССР, В и Ц свечение в области 660 нм не регистрируется.

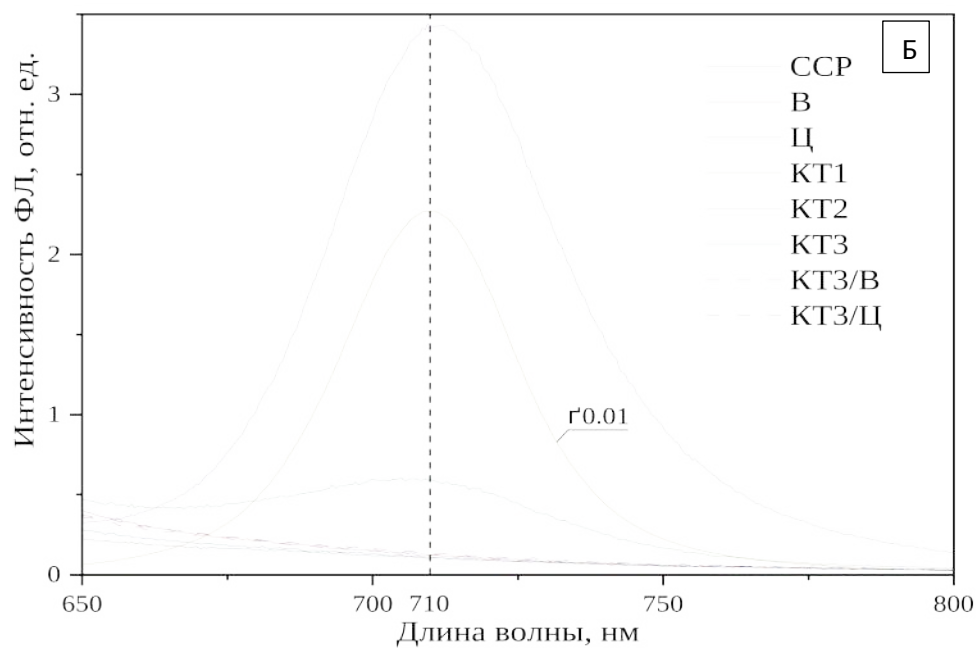
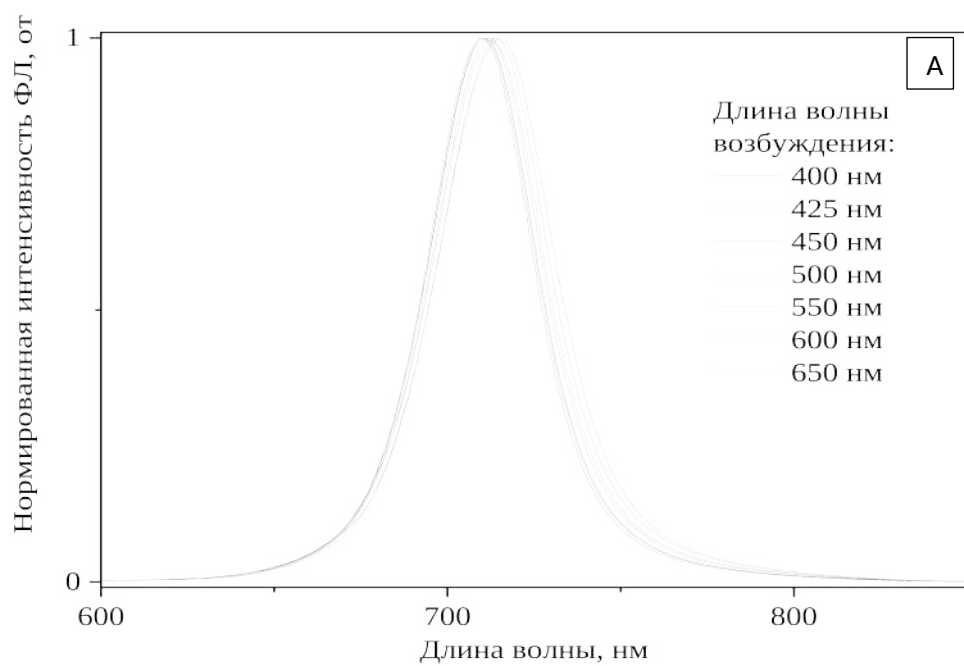
Данное явление демонстрирует, что разведение растворов дополнительными химическими соединениями приводит к пропорциональному снижению люминесцентных свойств конъюгатов, которое согласуется с отсутствием признаков химического влияния растворов конъюгатов и АБ друг на друга (отсутствуют признаки деактивации соединений).

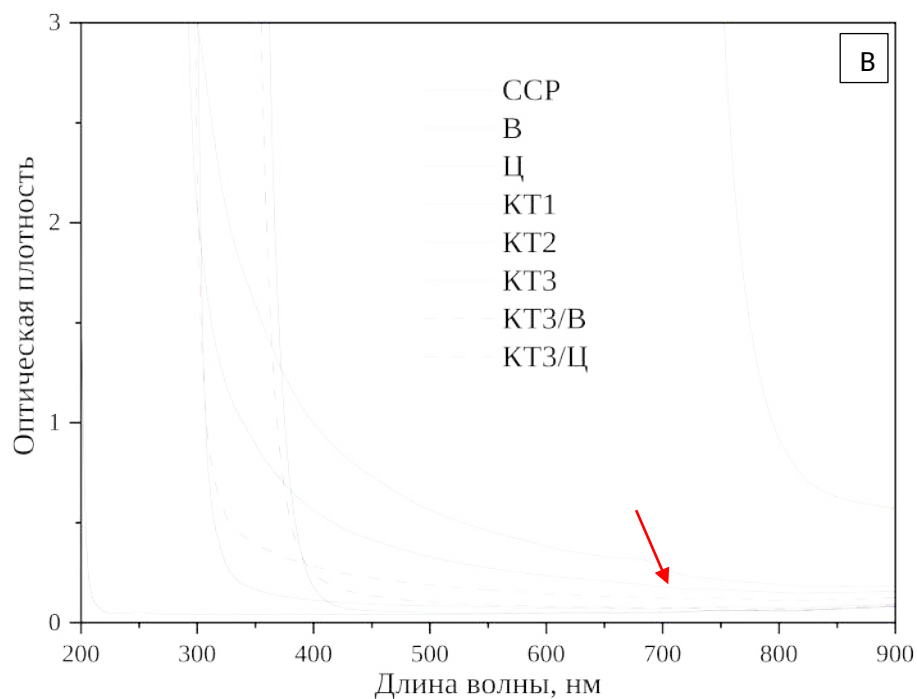
Из Рисунка 47Б видно, что в ряду растворов КТ1а–КТ3а граница резкого увеличения оптической плотности сдвигается в область коротких длин волн от

725 до 250 нм, а для ССР регистрируется в области 210 нм. Для растворов КТ2а наблюдаются полосы экситонного поглощения в области 600 нм (красная стрелка, визуально определяется при масштабировании), что соответствует ранее описанным результатам [208, 210]. В то же время для раствора КТ3а регистрируются также полосы оптической плотности при 325 и 275 нм, обусловленные абсорбцией ультрафиолетового излучения оболочками ZnSe и ZnS, что соответствует результатам в литературе [209, 207]. Для биоконъюгатов КТ3а/В и КТ3а/Ц граница резкого увеличения оптической плотности в области 350 и 400 нм формируется растворами используемых АБ соответственно. В длинноволновой области доминируют процессы оптического поглощения в КТ. Данные физические явления доказывают отсутствие химического и физического взаимодействия между КТ и АБ.

Оптические и люминесцентные свойства КТ CdTe/Cd и их конъюгатов для заднего отрезка глаза (Ванкомицин и Цефтазидим)

На Рисунке 48А представлены спектры флуоресценции раствора КТ1б при возбуждении в видимой области спектра, которые нормированы на свою максимальную интенсивность. Видно, что при изменении длины волны возбуждения от 400 до 650 нм положение максимума флуоресценции смещается от 710 до 715 нм, а полуширина составляет 36-39 нм. Этот факт свидетельствует о процессах фотовозбуждения исследуемых КТ в видимом спектральном диапазоне.





А – нормированные спектры флуоресценции раствора КТ16 (10%) при различных длинах волн возбуждения

Б – спектры флуоресценции

В – оптическая плотность

Рисунок 48 – Оптические свойства исследуемых растворов КТ CdTe/Cd и их конъюгатов

Из Рисунка 48Б видно, что для растворов КТ регистрируется полоса флуоресценции с положением максимума в области ≈ 710 нм при этом ее интенсивность уменьшается при их разбавлении ССР. Для всех остальных исследуемых растворов свечение в области 710 нм не наблюдается. Отметим, что для конъюгатов на основе исследуемых растворов КТ2б и АБ полоса флуоресценции в области ≈ 710 нм также не регистрируется (на Рисунке 47Б указанные спектры не приведены). Это, в свою очередь, указывает на появление дополнительного канала тушения люминесценции КТ в конъюгатах.

Из Рисунка 48В видно, что для растворов ССР, В и Ц край оптической плотности (резкое ее увеличение) регистрируется в области 210, 325 и 400 нм соответственно. При разбавлении КТ сбалансированным солевым раствором

край оптической плотности сдвигается в область коротких длин волн. Для раствора КТ2б наблюдается полоса экситонного поглощения при ≈ 680 нм (красная стрелка), в соответствии с [42]. Край оптической плотности для конъюгатов КТ3б/В и КТ3б/Ц формируется соответствующим антибиотиком. В длинноволновой области доминируют процессы, связанные с поглощением именно в квантовых точках.

В результате, на основании проведенного исследования абсорбционных и люминесцентных свойств полученных конъюгатов на основе Ванкомицина, Цефтазидима и КТ типа InP/ZnSe/ZnS и CdTe/Cd продемонстрирована полная химическая и физическая перекрестная ареактивность исследуемых компонент.

Оптические и люминесцентные свойства КТ CdTe/Cd и их конъюгатов для переднего отрезка глаза (с Левофлоксацином)

На Рисунке 49 приведены спектры оптической плотности и флуоресценции исследуемых растворов Л и КТ/Л.

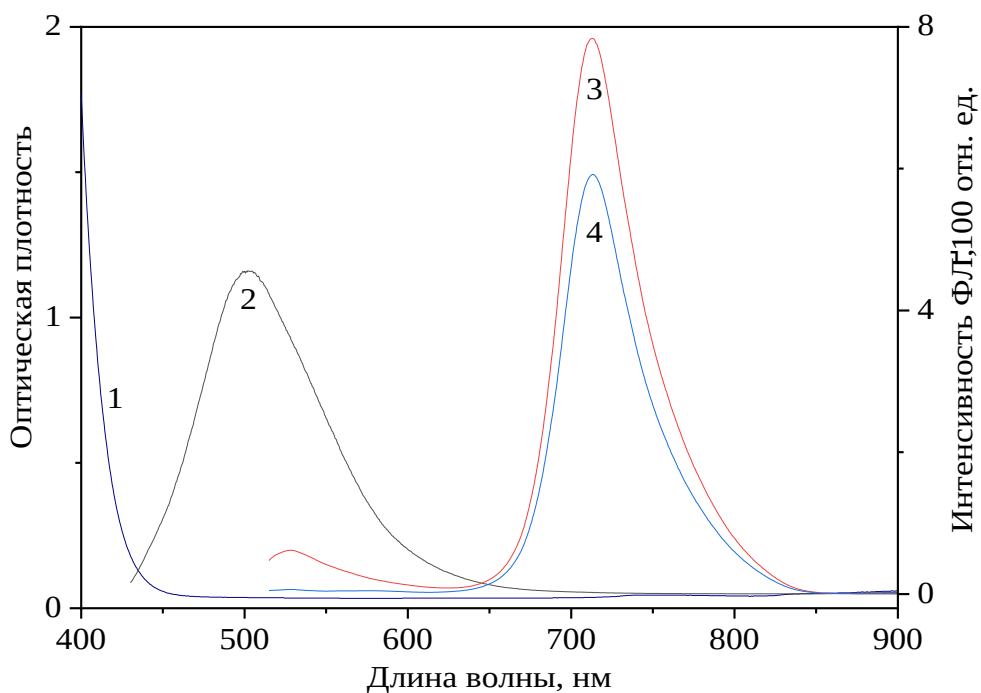


Рисунок 49 – Спектры оптической плотности (кривая 1) и флуоресценции (кривые 2-4). Левофлоксацин (кривая 1 и 2) и КТ/Л (кривая 3 при возбуждении в полосе 400 нм и 4 – при 450 нм)

Из Рисунка 49 видно, что для раствора Л в области 400-450 нм регистрируется граница резкого увеличения оптической плотности (кривая 1), и при возбуждении в полосе 400 нм наблюдается широкая интенсивная полоса флуоресценции в диапазоне 450-600 нм с максимумом ≈ 500 нм (кривая 2). В то же время для раствора КТ/Л оптическая плотность >3 во всем исследуемом спектральном диапазоне (на Рисунке спектр оптической плотности не показан). Кроме того, при возбуждении в полосе 400 нм наблюдается свечение КТ с максимумом ≈ 710 нм и люминесценция раствора Л при длине волны <600 нм (кривая 3). Отметим, что при возбуждении в полосе 450 нм регистрируется только люминесценция КТ в исследуемом растворе КТ/Л (кривая 4).

Исходя из полученных данных по созданию конъюгатов между КТ CdTe/Cd МРА 710 и Левофлоксацином, даже в нативной концентрации абсорбционные и люминесцентные свойства в спектральном диапазоне 450-900 нм аттестуемого конъюгата не определяются именно квантовыми точками, что аналогично говорит о полной химической и физической ареактивности исследуемых компонент.

Оптические и люминесцентные свойства КТ InP/ZnSe/ZnS 650 и их конъюгатов для переднего отрезка глаза (с Тобрамицином)

На Рисунке 50 приведены спектры флуоресценции и оптической плотности исследуемых растворов Т и КТ/Т.

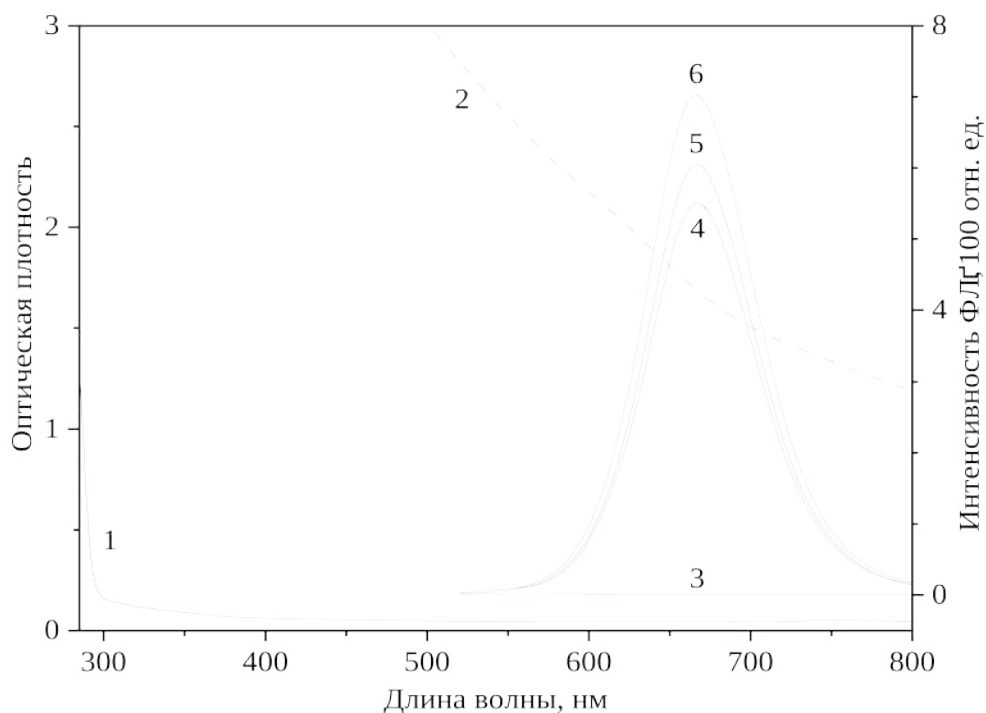


Рисунок 50 – Спектры оптической плотности (кривые 1 и 2) и флуоресценции (кривые 3-6). Раствор Т (кривые 1 и 3) и комплекса КТ/Т (кривые 2 и 4-6)

Из Рисунка 50 видно, что для раствора Т в области 290-300 нм регистрируется граница резкого увеличения оптической плотности (кривая 1), а в видимом диапазоне (>400 нм) величина оптической плотности соответствует фоновым значениям. Этот факт подтверждается отсутствием флуоресценции раствора Т при возбуждении в диапазоне 400-500 нм (на Рисунке 50 приведена кривая 3 для полосы возбуждения 450 ± 5 нм). В то же время для комплекса КТ/Т оптическая плотность >3 во всем исследуемом спектральном диапазоне (на Рисунке 50 кривая оптической плотности не показана). Этот факт свидетельствует о сильном рассеянии и поглощении света квантовыми точками. Даже для комплекса КТ/Т с объемным содержанием КТ и Тобрамицина в соотношении 1:40 наблюдается значительное рассеяние и поглощение света КТ (кривая 2). При возбуждении исследуемого комплекса КТ/Т в полосах 400 ± 5 (кривая 6), 450 ± 5 (кривая 5) и 500 ± 5 нм (кривая 4) регистрируется свечение КТ с максимумом ≈ 660 нм. Отметим, что при возбуждении в диапазоне 400-500 нм наблюдается только люминесценция КТ в исследуемом комплексе КТ/Т (кривые 4-6).

На основании полученных данных можно сделать заключение, что абсорбционные и люминесцентные свойства в спектральном диапазоне 400-800 нм аттестуемого комплекса на основе КТ InP/ZnSe/ZnS 650 с Тобрамицином определяются квантовыми точками и доказывает химическую и физическую ареактивность исследуемых компонент.

4.5. Анализ влияния внешних факторов на активность квантовых точек

4.5.1. Анализ влияния температурных изменений на клиническую активность квантовых точек

Как было описано ранее, температурные колебания способны оказывать влияние на физико-химические свойства КТ и соответственно – на их антиинфекционную активность. Учитывая тот факт, что в условиях воспалительного процесса в глазу температура может существенно варьировать, данный аспект требует изучения.

На Рисунке 51 изображен флуоресцентный спектрометр Perkin Elmer LS 55 (Analitical Science, США) с исследуемым образцом квантовых точек.

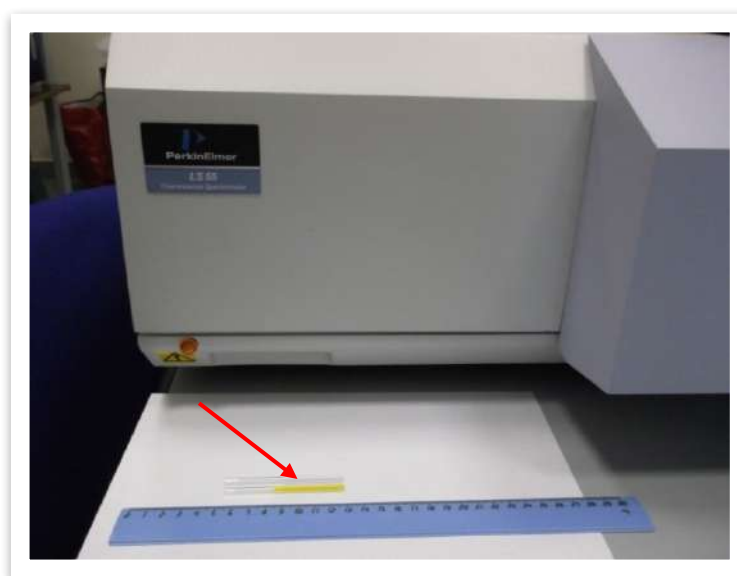


Рисунок 51 – Флуоресцентный спектрометр Perkin Elmer LS55 с исследуемым образцом квантовых точек (в кувезе для измерения – стрелка)

На Рисунке 52 видно, что спектры возбуждения и эмиссии исследуемых КТ остаются пропорционально неизменными при варьировании температурного режима.

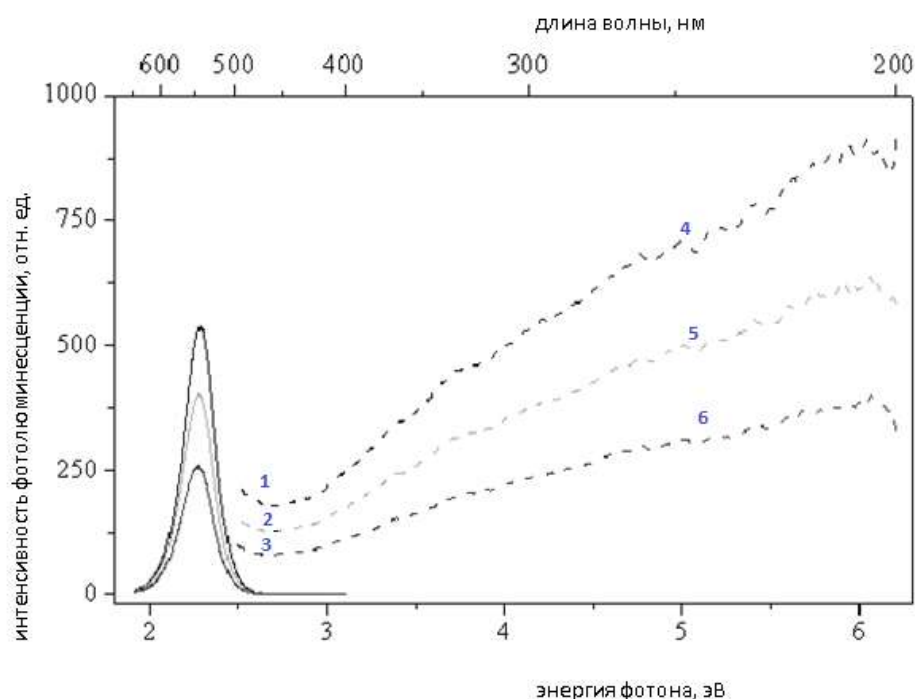


Рисунок 52 – Спектры возбуждения и флуоресценции квантовых точек InP/ZnSe/ZnS 650 при различных температурах образца:
1-3 – спектры эмиссии; 4-6 – спектры возбуждения
(1, 4 – при температуре 22°C; 2, 5 – при 37°C; 3, 6 – при 50°C)

Результаты, продемонстрированные на Рисунке 53, свидетельствуют о зависимости усредненного спектра свечения КТ от температуры. В диапазоне от 22° до 50°C наблюдается смещение пика не более чем на 5 нм, что коррелирует с результатами экспериментальных исследований в опубликованной работе [145] и указывает на возможность стабильного состояния конъюгатов в условиях изменения температуры при контакте с биологическими средами человеческого организма.

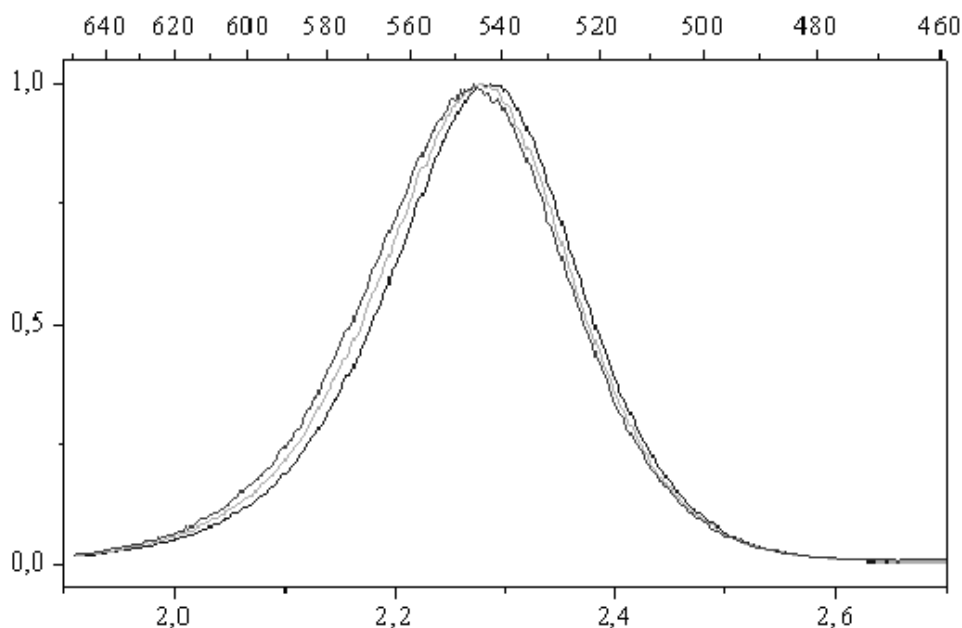


Рисунок 53 – Спектры эмиссии квантовых точек InP/ZnSe/ZnS 650 при возбуждении в полосе 300 нм: 1 – при температуре 22⁰; 2 (серая линия) – при 37⁰; 3 – при 50⁰

На основании проведенных исследований можно заключить, что исследуемые КТ не меняют своих физических свойств при варьировании температурного режима.

4.5.2. Анализ влияния биологического окружения на клиническую активность квантовых точек

Биологическое окружение в виде воспалительных и иммунокомпетентных клеток также способно изменять особенности физико-химического взаимодействия КТ с субстратом. Данное явление требует введения в реакцию чужеродного белка, в качестве которого выступают антитела к вирусу H1N1, способные потенциально влиять на термодинамическую, физическую и химическую организацию исследуемых конъюгатов.

На Рисунке 54 изображен коллоидный раствор КТ в физиологическом растворе (образец 1), в физиологическом растворе с антителами (образец 2).

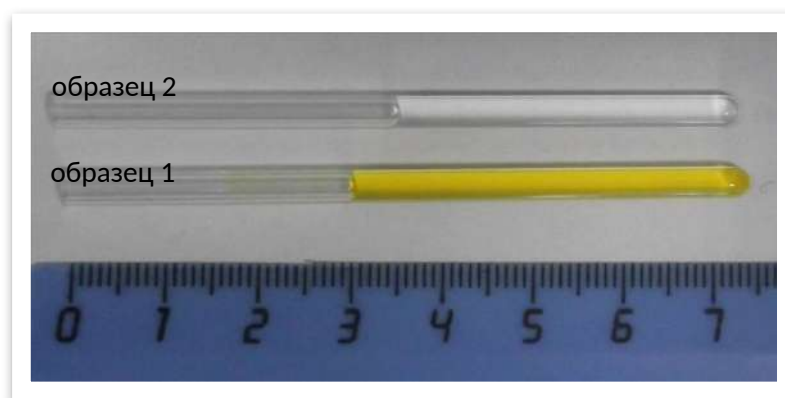
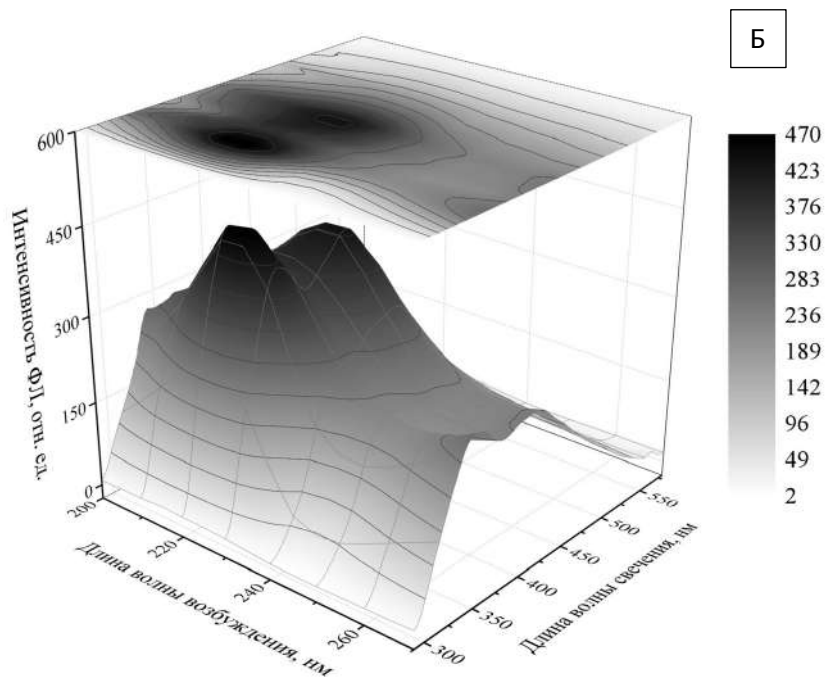
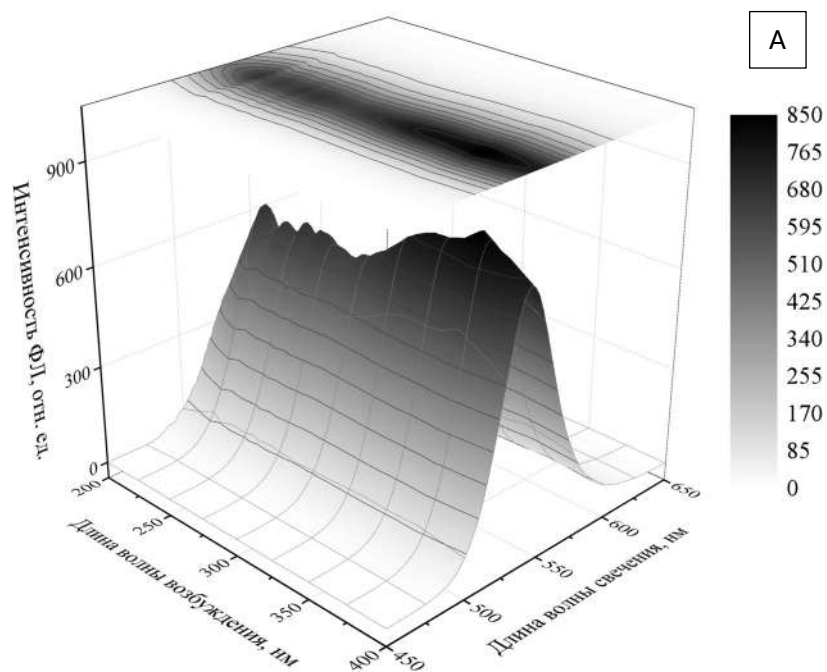


Рисунок 54 – Коллоидный раствор КТ в физиологическом растворе (образец 1), в физиологическом растворе с антителами (образец 2)

Полученные данные демонстрируют, что максимум спектра возбуждения образца 1 незначительно сместился по сравнению паспортными данными с 300 до 370 нм, вероятнее всего из-за образования конъюгатов КТ с ионами NaCl (результат разведения). Максимум спектра эмиссии находится на длине волны 538,5 нм (Рисунок 55А).

Спектр флуоресценции образца 2 претерпел существенные изменения. Ввиду того, что 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 (Рисунок 55Б).

На основании этого можно сделать заключение, что биологическое окружение способно оказать влияние на оптические и люминесцентные свойства КТ, а следовательно, на процессы генерации АФК. Если применить данное заключение к клинической практике, то вероятнее всего эпibuльбарные инстилляциИ КТ не будут подвержены смещению спектров возбуждения и эмиссии, в то же время интравитреальное введение конъюгатов лучше сочетать с удалением патологического субстрата из витреальной полости для минимизации рисков воздействия биологических и химических субстратов.



А – образец 1 (KT InP/ZnSe/ZnS 650)

Б – образец 2 (комплекс с антителами к вирусу H1N1)

Рисунок 55 – Спектр флуоресценции при комнатной температуре 22°C

4.6. Возможности стерилизации квантовых точек с помощью трековых мембран для офтальмологического использования

Учитывая описанную ранее перспективность стерилизации КТ посредством трековых мембран, исследуемые КТ Ag(10%):InP/ZnS МРА пропускали через трековую мембрану. Серию растворов КТ (n=20) в разведении 1/10 к сбалансированному солевому раствору под давлением пропускали через трековую мембрану, вставленную в сочленение между подыгольным конусом и дистальной частью канюли шприца, с последующим бактериологическим посевом. В качестве контроля (n=20) растворы КТ вышеописанным способом проходили через пустую систему сочленения шприца.

На Рисунке 56 изображен процесс пропускания нестерильного раствора КТ Ag(10%):InP/ZnS МРА через трековую мембрану под давлением (нажатие на поршень шприца).



Рисунок 56 – Процесс пропускания нестерильного раствора КТ Ag(10%):InP/ZnS МРА через трековую мембрану под давлением

На Рисунке 57 изображен процесс внесения раствора КТ, пропущенного через трековую мембрану, на питательную среду сплошным слоем.

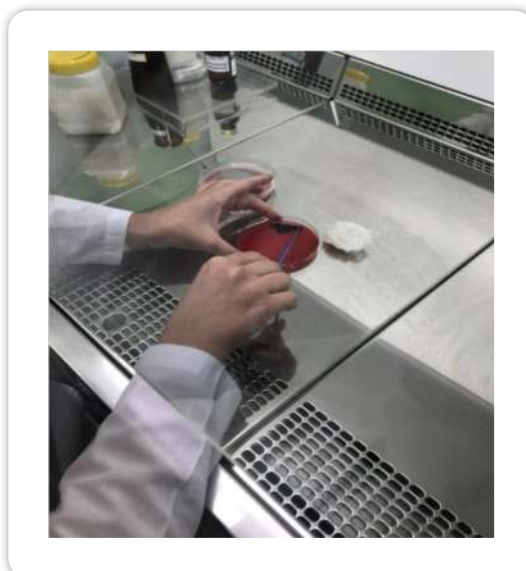


Рисунок 57 – Процесс внесения раствора КТ, пропущенного через трековую мембрану, на питательную среду сплошным слоем

Техническое исполнение процесса пропускания раствора КТ через трековую мембрану (n=20) не вызывало затруднения и определялось силой компрессионного воздействия на поршень шприца, что без сомнения мануально вызывало приложение больших сил воздействия в сравнении с контрольной группой (n=20).

По результатам бактериологического исследования, в основной группе рост не был выявлен ни в одном случае, в контрольной группе – рост *S.epidermidis* был выявлен в чашке № 5 (Таблица 17), где П№ – номер чашки Петри (1 – положительный рост, 2 – отрицательный рост).

Таблица 17 – Результаты бактериологического исследования

П1-2	П2-2	П3-2	П4-2	П5-2	П6-2	П7-2	П8-2	П9-2	П10-2
П11-2	П12-2	П13-2	П14-2	П15-2	П16-2	П17-2	П18-2	П19-2	П20-2

а) основная группа

П1-2	П2-2	П3-2	П4-2	П5-1	П6-2	П7-2	П8-2	П9-2	П10-2
П11-2	П12-2	П13-2	П14-2	П15-2	П16-2	П17-2	П18-2	П19-2	П20-2

б) – контрольная группа

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что техническое прохождение КТ через трековую мембрану осуществимо. Диаметр пор трековой мембраны, равный 50 нм, гарантированно задерживает потенциальных возбудителей бактериальной инфекции, в силу среднего размера бактериальной клетки 200-500 мкм. Отсутствие роста патогенной флоры в контрольной группе, вероятнее всего обусловлено собственными антиинфекционными свойствами КТ, однако это требует дальнейшего изучения. Данные, полученные в данном разделе диссертации, коррелируют с данными, полученными в предыдущих исследованиях [31].

Таким образом, в результате проведения физико-химических, биологических и фармакологических исследований для обоснования возможности применения квантовых точек и конъюгатов на их основе для лечения антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза установлена возможность синтеза КТ с заданными физико-химическими параметрами, адаптированными для офтальмологического применения; доказана способность исследуемых КТ к образованию АФК в сверхмалых масс. концентрациях, достигающих предела в 1000-кратных разведениях в видимой области спектра, вне зависимости от продолжительности их облучения в видимой области спектра и зависящих от состояния pH среды; установлена способность КТ к адгезии, проникновению в структуры бактериальной клетки с последующим ее разрушением; выявлено, что все исследуемые типы КТ не формируют химического и физического взаимодействия с АБ вне зависимости от концентрации КТ, типа и концентрации АБ; установлено отсутствие влияния температурных колебаний на физическую активность КТ, что указывает на возможность стабильного состояния нанобиокомплекса в условиях изменения температуры при контакте с биологическими средами человеческого организма; выявлено негативное влияние биологического окружения на оптические и люминесцентные свойства КТ, а следовательно, на процессы генерации АФК. На основании результатов исследования, посвященных возможности

стерилизации КТ с помощью трековых мембран, установлено, что техническое прохождение КТ через них осуществимо и может быть использовано как метод стерилизации КТ в клинической практике.

ГЛАВА 5. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ И ЦИТОГИСТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК И КОНЬЮГАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ

Целью данной главы явилось лабораторное и клинико-экспериментальное обоснование эффективности использования квантовых точек и конъюгатов на их основе в лечении антибиотикорезистентных инфекций глаза, а также доказательство безопасности их применения в офтальмологической практике посредством изучения их влияния на организм лабораторных животных на анатомическом, функциональном, тканевом и клеточном уровнях.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить ряд задач:

- с помощью бактериологических методов исследования *in vitro* изучить влияние квантовых точек и конъюгатов на их основе на возбудителей бактериальных инфекций глаза, в том числе антибиотикорезистентных;
- экспериментально доказать антибактериальную активность квантовых точек и конъюгатов на их основе в отношении антибиотикорезистентной G^+ и G^- микрофлоры, путем проведения моделирования инфекционного воспалительного процесса на переднем и заднем отрезках глаза у лабораторных животных;
- изучить клеточную, тканевую, анатомическую и функциональную безопасность квантовых точек и конъюгатов на их основе с помощью клинических, функциональных, гистоморфологических и цитологических методов исследования на лабораторных животных.

5.1. Анализ антибактериальной активности квантовых точек и конъюгатов на их основе в отношении антибиотикорезистентных возбудителей инфекционных офтальмологических заболеваний *in vitro*

На Рисунке 59 изображен процесс формирования зон задержки роста (ЗЗР) при постановке эксперимента. Чашка Петри (А) демонстрирует формирование ЗЗР с дисками без нанесения КТ. Чашка Петри (Б), в свою очередь, демонстрирует значительное увеличение ЗЗР при нанесении на диск раствора КТ.



Рисунок 59 – Пример формирования ЗЗР на чашках Петри с дисками без нанесения КТ (А) и с нанесенными КТ CdTe/Cd МРА 710 (Б)

На Рисунке 60 изображен термостат с помещенными в него чашками Петри в ходе проведения эксперимента. На верхней полке помещен аккумулятор бесперебойного питания со светодиодной лентой, задачей которой является возбуждение КТ в широком диапазоне частот для анализа динамики их антиинфекционной активности в условиях световой индукции.



Рисунок 60 – Фаза инкубации в термостате в условиях фотовозбуждения КТ

Полученные результаты по динамическому изменению ЗЗР приведены в Таблицах 18-23. Для удобства восприятия изменение ЗЗР выделено красным цветом. Также для удобства анализа штаммы разделены на амбулаторные и госпитальные.

Амбулаторные (выделенные в лаборатории) штаммы микроорганизмов

Таблица 18 – Образование ЗЗР у амбулаторных штаммов микроорганизмов под источником возбуждения при взаимодействии с КТ типа CdTe/Cd МРА 710 10% масс. в различных концентрациях

Микроорганизм/АБ	Зона задержки роста (мм) с источником возбуждения (светодиодная лента) / без источника возбуждения			
	Тип КТ – CdTe/Cd МРА 710 10% масс.			
	«Чистый» АБ	КТ в разведении (1%)	КТ в разведении (0,1%)	КТ в разведении (0,01%)
St.aureus/Ванкомицин	17	17/17	17/17	17/17
St.aureus/Левифлоксацин	26	29/29	29/29	29/29
St.epidermidis/Ванкомицин	18	19/21	19/21	19/21
St.epidermidis/Левифлоксацин	30	30/31	30/31	30/31
E.faecalis/Ванкомицин	17	18/18	18/18	18/18
E.faecalis/Левифлоксацин	22	23/24	22/22	22/21
Esch.coli/Цефотаксим	27	32/31	29/29	27/27
Esch.coli/Цефтазидим	24	30/30	28/28	25/26
Kl.pneumoniae/Цефотаксим	33	36/35	34/35	33/35
Kl.pneumoniae/Цефтазидим	30	31/30	32/33	30/31
Ps.aeruginosa /Цефотаксим	16	29/25	24/21	19/16
Ps.aeruginosa/ Цефтазидим	25	25/26	25/26	25/26

Таблица 19 – Образование ЗЗР у амбулаторных штаммов микроорганизмов под источником возбуждения при взаимодействии с КТ типа InP/ZnSe/ZnS 650 10% масс. в различных концентрациях

Микроорганизм/АБ	Зона задержки роста (мм) с источником возбуждения (светодиодная лента) / без источника возбуждения			
	Тип КТ – InP/ZnSe/ZnS 650 10% масс.			
	«Чистый» АБ	КТ в разведении (1%)	КТ в разведении (0,1%)	КТ в разведении (0,01%)
St.aureus/Ванкомицин	17	17/17	17/17	17/17
St.aureus/Левифлоксацин	26	29/29	29/29	29/29
St.epidermidis/Ванкомицин	18	18/18	18/18	18/19
St.epidermidis/Левифлоксацин	30	29/29	29/29	29/29
E.faecalis/Ванкомицин	17	17/17	17/18	17/17
E.faecalis/Левифлоксацин	22	22/22	22/23	22/22
Esch.coli/Цефотаксим	27	30/31	28/28	27/28
Esch.coli/Цефтазидим	24	26/26	24/25	23/23
Kl.pneumoniae/Цефотаксим	33	35/25	33/33	32/33
Kl.pneumoniae/Цефтазидим	30	33/34	32/31	32/30
Ps.aeruginosa /Цефотаксим	16	29/25	28/21	27/16
Ps.aeruginosa/ Цефтазидим	25	26/26	26/26	26/26

Таблица 20 – Образование ЗЗР у амбулаторных штаммов микроорганизмов под источником возбуждения при взаимодействии с КТ типа Ag(10%):InP/ZnS МРА 10% масс. в различных концентрациях

Микроорганизм/ АБ	Зона задержки роста (мм) с источником возбуждения (светодиодная лента) / без
-------------------	--

	источника возбуждения			
	Тип КТ - Ag(10%):InP/ZnS МРА 10% масс.			
	«Чистый» АБ	КТ в разведении (1%)	КТ в разведении (0,1%)	КТ в разведении (0,01%)
St.aureus/Ванкомицин	17	21/20	21/20	21/20
St.aureus/Левифлоксацин	26	33/31	32/32	33/33
St.epidermidis/Ванкомицин	18	26/25	25/25	26/26
St.epidermidis/Левифлоксацин	30	30/30	30/30	30/30
E.faecalis/Ванкомицин	17	21/19	22/19	21/19
E.faecalis/Левифлоксацин	22	28/29	28/28	28/26
Esch.coli/Цефотаксим	27	28/28	28/28	27/28
Esch.coli/Цефтазидим	24	25/24	25/24	25/24
Kl.pneumoniae/Цефотаксим	33	35/28	33/29	32/32
Kl.pneumoniae/Цефтазидим	30	33/33	32/33	32/33
Ps.aeruginosa /Цефотаксим	16	30/29	31/30	31/31
Ps.aeruginosa/ Цефтазидим	25	29/26	29/26	29/26

Госпитальные (выделенные от пациентов) штаммы микроорганизмов

Таблица 21 – Образование ЗЗР у госпитальных штаммов микроорганизмов под источником возбуждения при взаимодействии с КТ типа CdTe/Cd МРА 710 10% масс. в различных концентрациях

Микроорганизм/АБ	Зона задержки роста (мм) с источником возбуждения (светодиодная лента) / без источника возбуждения			
	Тип КТ – CdTe/Cd МРА 710 10% масс.			
	«Чистый» АБ	КТ в разведении (1%)	КТ в разведении (0,1%)	КТ в разведении (0,01%)
St.aureus/Ванкомицин	20	20/22	20/22	20/22
St.aureus/Левифлоксацин	28	32/32	30/32	32/32
St.epidermidis/Ванкомицин	19	19/21	19/21	19/20
St.epidermidis/Левифлоксацин	30	30/31	30/31	30/30
E.faecalis/Ванкомицин	16	16/17	16/17	16/17
E.faecalis/Левифлоксацин	16	19/20	19/20	19/20
Esch.coli/Цефотаксим	26	33/31	29/30	26/28
Esch.coli/Цефтазидим	24	28/29	28/28	25/26
Kl.pneumoniae/Цефотаксим	6	6/6	6/6	6/6
Kl.pneumoniae/Цефтазидим	6	6/6	6/6	6/6
Ps.aeruginosa /Цефотаксим	6	23/21	19/18	11/9
Ps.aeruginosa/ Цефтазидим	20	23/23	22/22	20/20

Таблица 22 – Образование ЗЗР у госпитальных штаммов микроорганизмов под источником возбуждения при взаимодействии с КТ типа InP/ZnSe/ZnS 650 10% масс. в различных концентрациях

Микроорганизм/ АБ	Зона задержки роста (мм) с источником возбуждения (светодиодная лента) / без источника возбуждения			
	Тип КТ - InP/ZnSe/ZnS 650 10% масс.			
	«Чистый» АБ	КТ в разведении (1%)	КТ в разведении (0,1%)	КТ в разведении (0,01%)
St.aureus/Ванкомицин	20	20/20	20/20	20/20
St.aureus/Левифлоксацин	28	30/32	30/32	30/32
St.epidermidis/Ванкомицин	19	18/20	18/20	18/20
St.epidermidis/Левифлоксацин	30	30/30	29/30	29/30
E.faecalis/Ванкомицин	16	17/17	17/17	17/17
E.faecalis/Левифлоксацин	16	19/20	19/20	19/20
Esch.coli/Цефотаксим	26	31/30	28/29	26/28
Esch.coli/Цефтазидим	24	25/27	25/26	25/26
Kl.pneumoniae/Цефотаксим	6	6	6	6
Kl.pneumoniae/Цефтазидим	6	6	6	6
Ps.aeruginosa /Цефотаксим	16	23/20	20/17	10/8
Ps.aeruginosa/ Цефтазидим	20	23/21	23/21	20/21

Таблица 23 – Образование ЗЗР у госпитальных штаммов микроорганизмов под источником возбуждения при взаимодействии с КТ типа Ag(10%):InP/ZnS МРА 10% масс. в различных концентрациях

Микроорганизм/ АБ	Зона задержки роста (мм) с источником
-------------------	---------------------------------------

	возбуждения (светодиодная лента) / без источника возбуждения			
	Тип КТ – Ag(10%):InP/ZnS МРА 10% масс.			
	«Чистый» АБ	КТ в разведении (1%)	КТ в разведении (0,1%)	КТ в разведении (0,01%)
St.aureus/Ванкомицин	20	23/23	23/23	23/23
St.aureus/Левифлоксацин	28	32/32	32/32	32/32
St.epidermidis/Ванкомицин	19	30/30	30/30	30/30
St.epidermidis/Левифлоксацин	30	32/32	32/32	32/32
E.faecalis/Ванкомицин	16	18/18	17/17	17/17
E.faecalis/Левифлоксацин	16	17/17	17/17	17/17
Esch.coli/Цефотаксим	26	33/30	28/28	28/28
Esch.coli/Цефтазидим	24	26/27	26/26	26/26
Kl.pneumoniae/Цефотаксим	6	16/10	16/10	16/10
Kl.pneumoniae/Цефтазидим	6	17/16	17/6	17/6
Ps.aeruginos /Цефотаксим	16	26/20	26/17	25/8
Ps.aeruginosa/ Цефтазидим	20	23/23	23/23	23/23

Из представленных в Таблицах 18-23 данных видно, что большинство микроорганизмов уже имели достаточно высокую чувствительность к используемым АБ в дисках (см. ЗЗР более 22 мм в столбце «Чистый» АБ). Однако вариабельность результатов демонстрирует увеличение активности КТ у разнородных групп микроорганизмов с разными видами АБ ($p \leq 0,05$).

Наличие или отсутствие источника возбуждения (света), в равной мере, как и степень разведения КТ, не продемонстрировали значимого увеличения активности конъюгатов КТ с различными АБ ($p \leq 0,05$). Это явление объясняется невозможностью полной изоляции КТ от источника возбуждения во время осуществления подготовительного этапа к бактериологическому исследованию. В свою очередь, КТ, являясь чрезвычайно реакционноспособными, под действием источника возбуждения сверхмалой

интенсивности запускают процессы синтеза АФК, вне зависимости от концентрации раствора.

Анализ чувствительности АБ и конъюгатов на основе КТ у амбулаторных штаммов микроорганизмов демонстрирует разнородное по признакам увеличение ЗЗР. Исходя из вариативности данных, их необходимо рассматривать изолированно.

В группе микроорганизмов *St.aureus* со всеми типами КТ получено увеличение ЗЗР, максимальную из которых продемонстрировали конъюгаты КТ типа $\text{Ag}(10\%):\text{InP}/\text{ZnS}$, среднее увеличение ЗЗР у которых составило $4,0 \pm 2,21$ мм (см. Таблицы 18-20), что расценивается как высокая активность (от 2 до 5 мм).

В группе *St.epidermidis* достоверное увеличение ЗЗР было получено только с конъюгатом $\text{Ag}(10\%):\text{InP}/\text{ZnS}$ /Ванкомицин, и составило в среднем $3,0 \pm 2,27$ мм (высокая активность).

В группах микроорганизмов *E. faecalis*, аналогично, увеличение ЗЗР было выявлено только у конъюгатов с КТ $\text{Ag}(10\%):\text{InP}/\text{ZnS}$, и составило в среднем $4,0 \pm 1,12$ мм (высокая активность).

В группах микроорганизмов *E.coli*, напротив конъюгаты КТ типа $\text{Ag}(10\%):\text{InP}/\text{ZnS}$ не продемонстрировали увеличения ЗЗР. В группе КТ типа CdTe/Cd и $\text{InP}/\text{ZnSe}/\text{ZnS}$ выявлено достоверное увеличение ЗЗР, которое составило $5,0 \pm 0,15$ мм, что расценивается как высокая активность.

В группах *Kl.pneumoniae* конъюгаты КТ типа $\text{Ag}(10\%):\text{InP}/\text{ZnS}$ не продемонстрировали увеличения ЗЗР, в свою очередь КТ типа CdTe/Cd и $\text{InP}/\text{ZnSe}/\text{ZnS}$ в различных разведениях продемонстрировали увеличение ЗЗР в среднем на $3,5 \pm 0,2$ мм (высокая активность).

Наибольшее увеличение ЗЗР было выявлено в группе *Ps.aeruginosa*, где все три типа КТ продемонстрировали увеличение ЗЗР в среднем на $7,5 \pm 1,25$ мм. При этом наибольшую активность проявляли КТ типа $\text{Ag}(10\%):\text{InP}/\text{ZnS}$. Однако КТ типа CdTe/Cd и $\text{InP}/\text{ZnSe}/\text{ZnS}$ практически не проявляли своей

активности с АБ Цефотаксимом (очень высокая активность) (см. Таблицы 18-20).

Госпитальные штаммы микроорганизмов, в целом, проявили более высокую чувствительность по сравнению с амбулаторными штаммами, в основном за счет расширенной активности КТ типа Ag(10%):InP/ZnS.

В группе *S.aureus* со всеми типами КТ в разных разведениях получено увеличение ЗЗР в среднем на $3\pm1,5$ мм, за исключением конъюгата с Ванкомицином и КТ типа InP/ZnSe/ZnS (высокая активность) (см. Таблицу 21).

В группе *S.epidermidis* активность проявили КТ типа Ag(10%):InP/ZnS, продемонстрировав увеличение ЗЗР на $3,6\pm1,5$ мм (высокая активность) (см. Таблицу 22).

В группе *E.faecalis*, напротив наименьшую активность проявили конъюгаты с КТ типа Ag(10%):InP/ZnS, в то время как КТ остальных типов продемонстрировали увеличение ЗЗР на $1,7\pm1,5$ мм, в особенности с Левофлоксацином (низкая активность) (см. Таблицы 21-23).

Группа *Esch.coli* продемонстрировала увеличение ЗЗР для всех типов КТ, в среднем на $3,7\pm1,5$ мм (высокая активность).

Один из интересных результатов был получен в ходе оценки активности КТ с полирезистентным штаммом *Kl.pneumoniae*, в ходе которого выявлено увеличение ЗЗР с КТ типа Ag(10%):InP/ZnS, в среднем на $7,6\pm1,2$ мм, при полном отсутствии эффекта от КТ двух остальных типов, что вероятнее всего связано с дополнительным воздействием Ag(10%), что расценивается как очень высокая активность.

В группе *Ps.aeruginosa* было выявлено увеличение ЗЗР для всех типов КТ, в среднем на $5,2\pm0,2$ мм, что явилось одним из самых интересных наблюдений, полученных в ходе диссертационного исследования, учитывая факт наибольшей вирулентности, наличия факторов агрессии, инвазии и защиты у данного вида возбудителей, (см. Таблицы 21-23, что расценивается как высокая активность).

Результаты прицельного исследования антиинфекционной активности КТ в отношении синегнойной инфекции представлены в Таблице 24, из которой видно, что госпитальный штамм *Ps. aeruginosa* не обладал чувствительностью к цефотаксиму, учитывая практически полное отсутствие изменения ЗЗР в чашке Петри, равной 6 мм. Однако при добавлении растворов КТ разных концентраций (от 1:10 до 1:1000) четко визуализировалась тенденция к значительному (!) увеличению ЗЗР, указывающая на чувствительность госпитального штамма *Ps.aeruginosa* к образованному конъюгату (КТ+АБ). При этом выявлено значительное снижение эффективной (более 2 мм) ЗЗР с уменьшением концентрации КТ. Источник возбуждения не продемонстрировал системного влияния на изменение ЗЗР в исследуемых образцах.

Таблица 24 – Результаты образования ЗЗР в исследуемых образцах, где μ – среднее арифметической совокупности ЗЗР

Pseudomonas Aeruginosa						
С источником возбуждения						
ЗЗР (мм)/раз-е	CdTe/Cd			InP/ZnSe/Zns		
	1:10	1:100	1:1000	1:10	1:100	1:1000
6 μ (цефотаксим)	23 μ	19 μ	11 μ	23 μ	20 μ	10 μ
Без источника возбуждения						
ЗЗР (мм)/раз-е	CdTe/Cd			InP/ZnSe/Zns		
	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

Анализ эффективности динамики изменения ЗЗР амбулаторных и госпитальных штаммов микроорганизмов представлен на Рисунках 61-66. Динамика ЗЗР определена по степеням в мм: до 2 мм – умеренная эффективность, 2-5 – высокая эффективность (отображается пунктирными линиями), более 5 – очень высокая, в зависимости от источника возбуждения

(красный – с источником возбуждения, черный – без источника возбуждения),
 типа АБ в конъюгате и вида возбудителя: 1 – St.aureus, 2 – St.epidermidis, 3 –
 E.faecalis, 4 – Esch.coli, 5 – Kl.pneumoniae, 6 – Ps.aeruginosa.

Амбулаторные штаммы

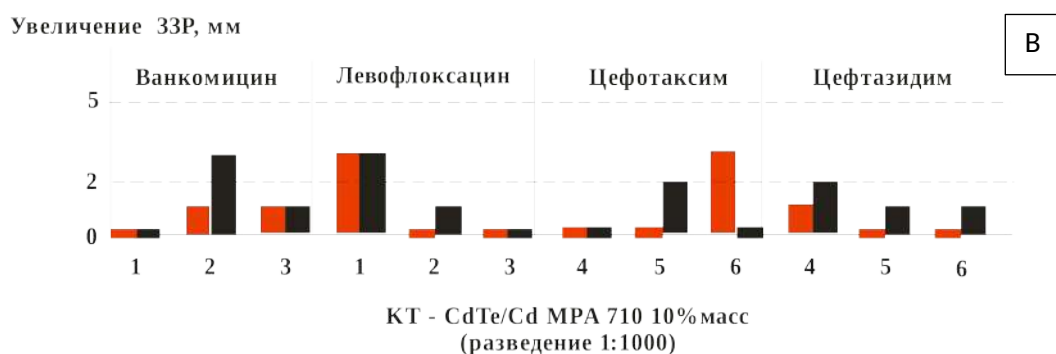
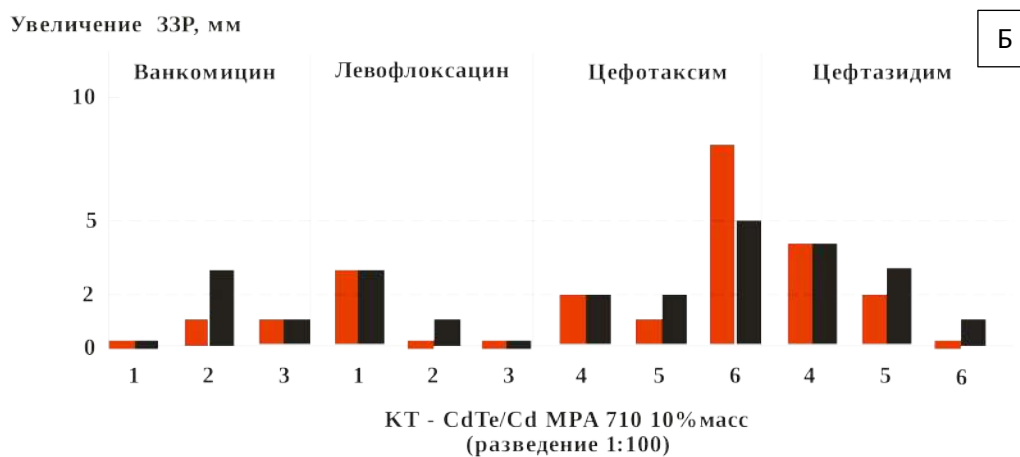
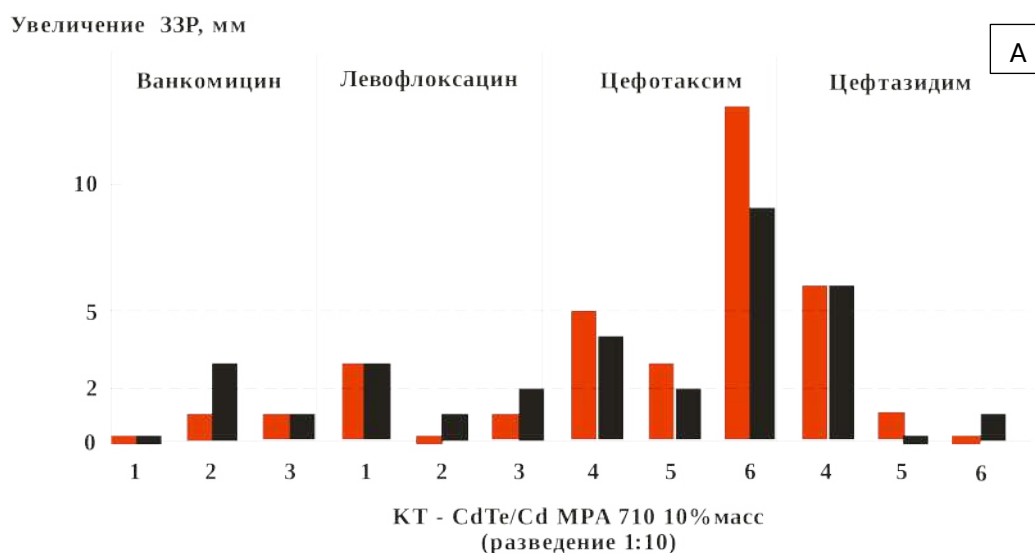


Рисунок 61 –Динамика изменения ЗЗР исследуемых КТ типа CdTe/Cd МРА 710 10% масс. в разведении: А – 1:10; Б – 1:100; В – 1:1000

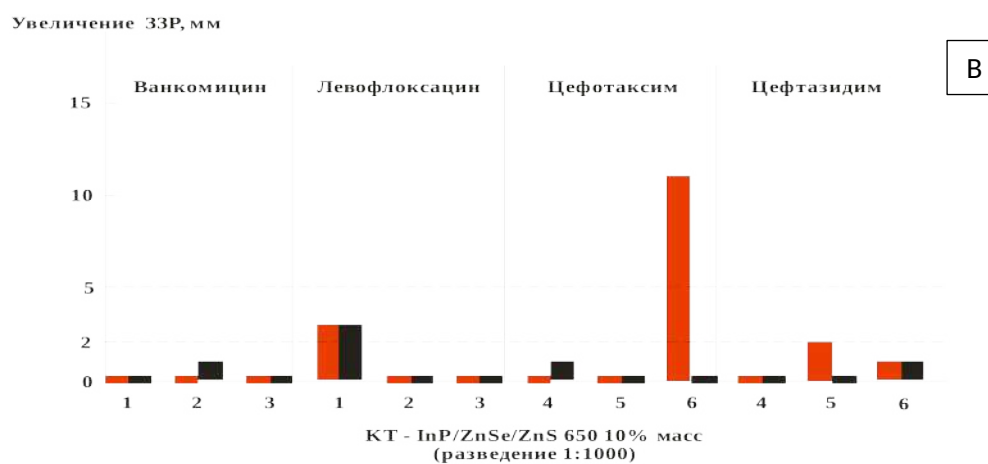
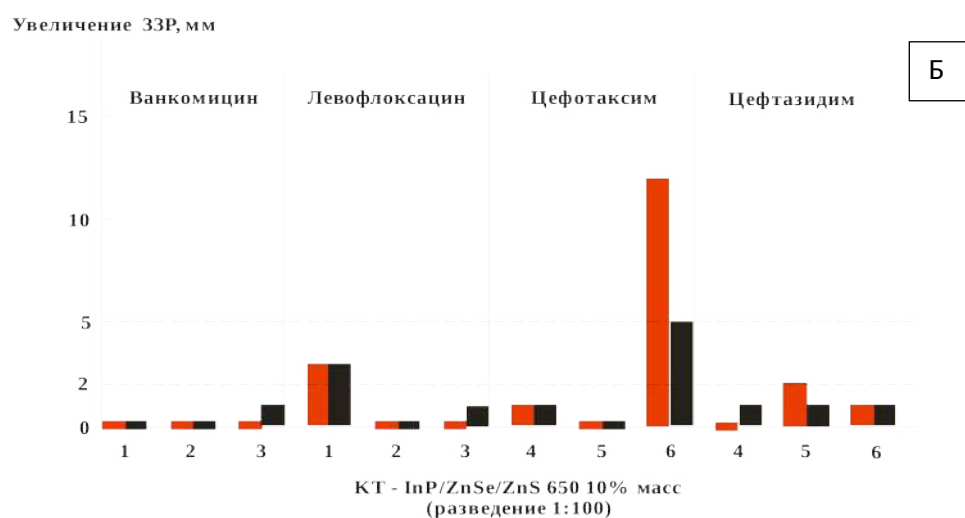
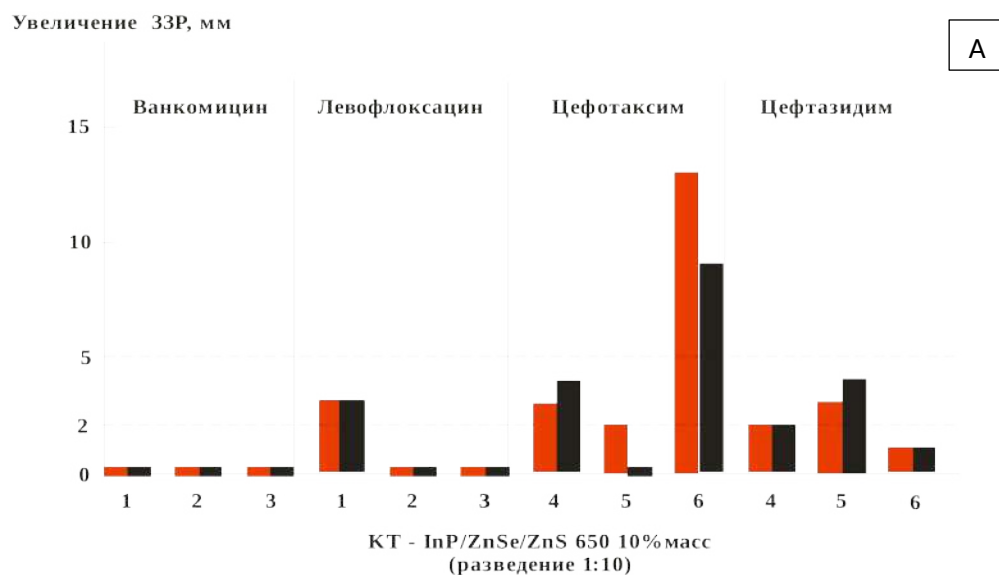


Рисунок 62 – Динамика изменения ЗЗР исследуемых КТ типа InP/ZnSe/ZnS 650 10% масс. в разведении: А – 1:10; Б – 1:100; В – 1:1000

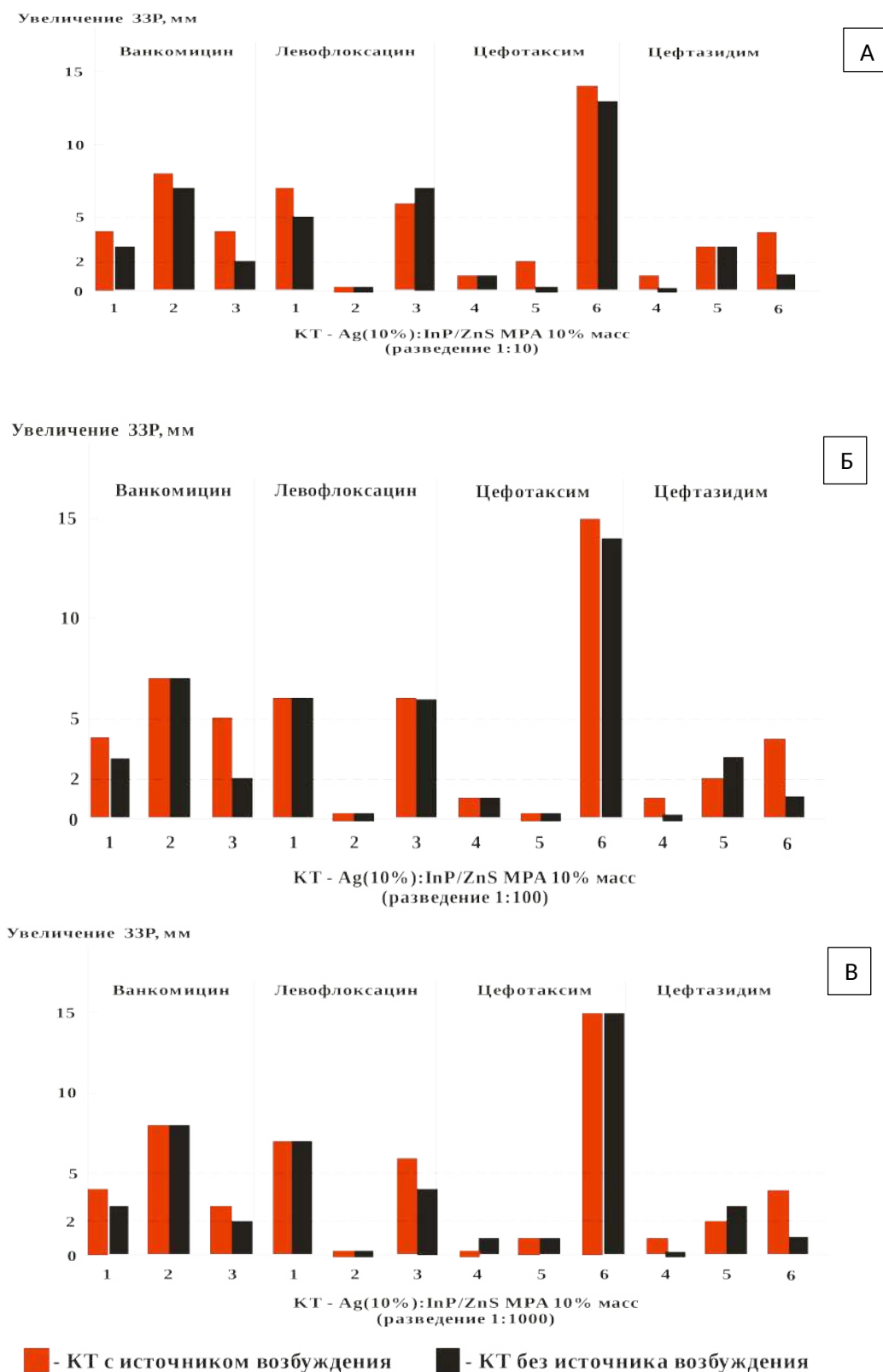
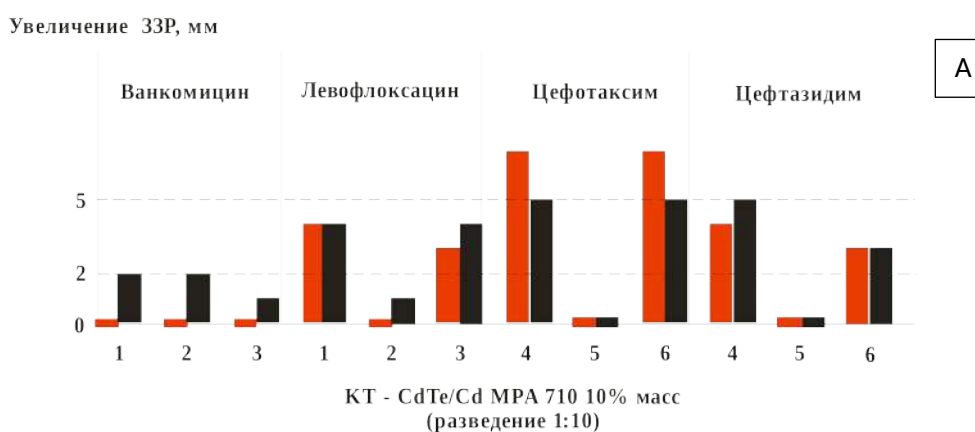


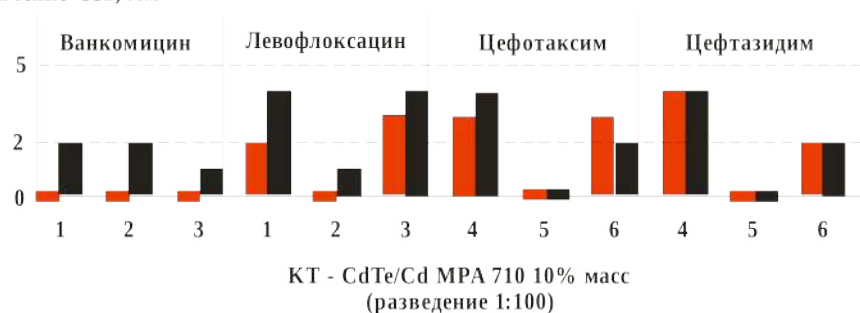
Рисунок 63 – Динамика изменения ЗЗР исследуемых КТ типа Ag(10%):InP/ZnS МРА 10% масс. в разведении: А – 1:10; Б – 1:100; В – 1:1000

Анализ динамики ЗЗР трех типов КТ в различном разведении показал, что 6% исследуемых амбулаторных штаммов микроорганизмов, вне зависимости от источника возбуждения и концентрации раствора КТ, имеют динамику ЗЗР в сравнении с АБ очень высокой эффективности (свыше 5 мм), 69% – высокой эффективности (2-5 мм), 9% – умеренной эффективности (до 2 мм), у 16% выявлено отсутствие увеличения ЗЗР ($p \leq 0,05$).

Госпитальные штаммы микроорганизмов

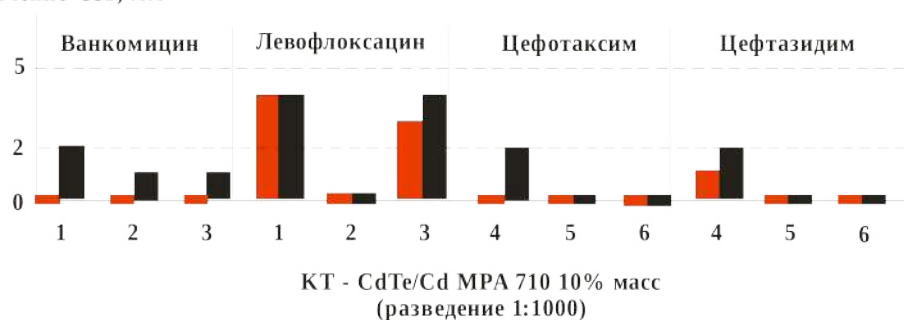


Увеличение ЗЗР, мм



Б

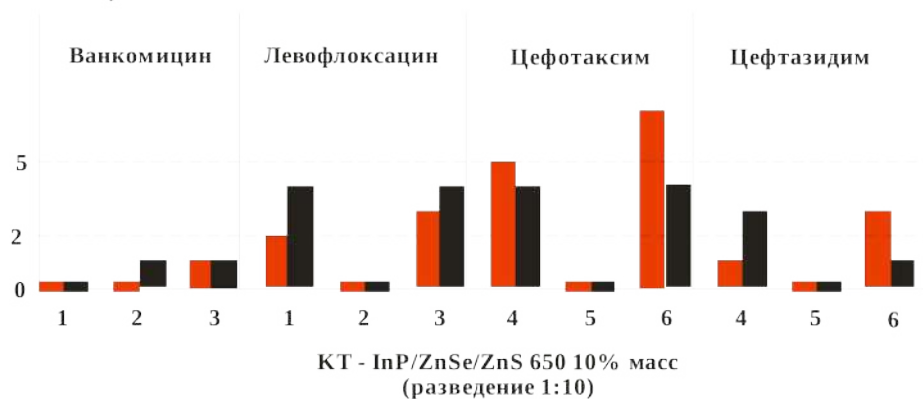
Увеличение ЗЗР, мм



В

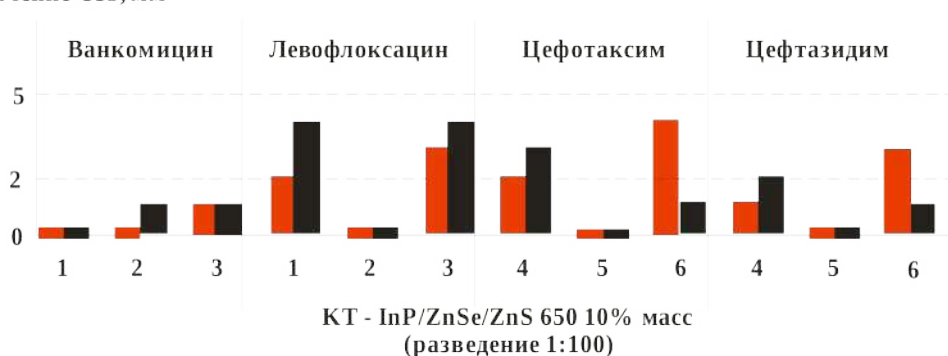
Рисунок 64 – Динамика изменения ЗЗР исследуемых КТ типа CdTe/Cd MPA 710 10% масс. в разведении: А – 1:10; Б – 1:100; В – 1:1000

Увеличение ЗЗР, мм



А

Увеличение ЗЗР, мм



Б

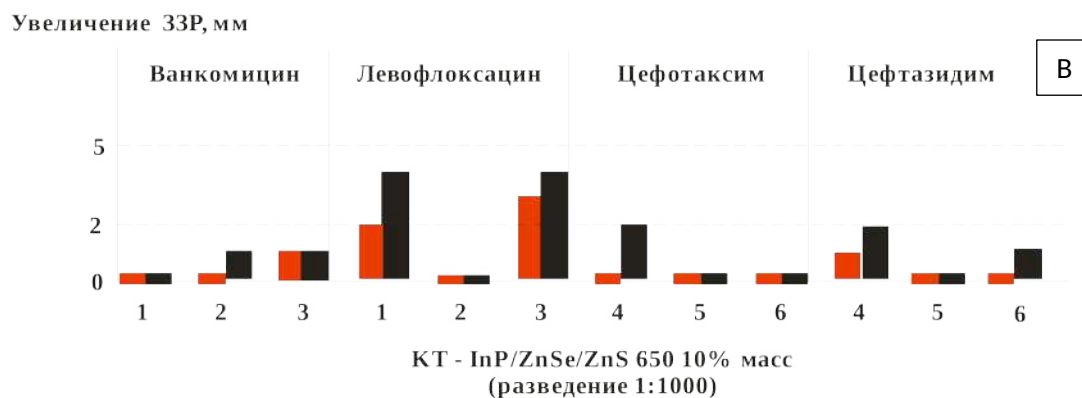
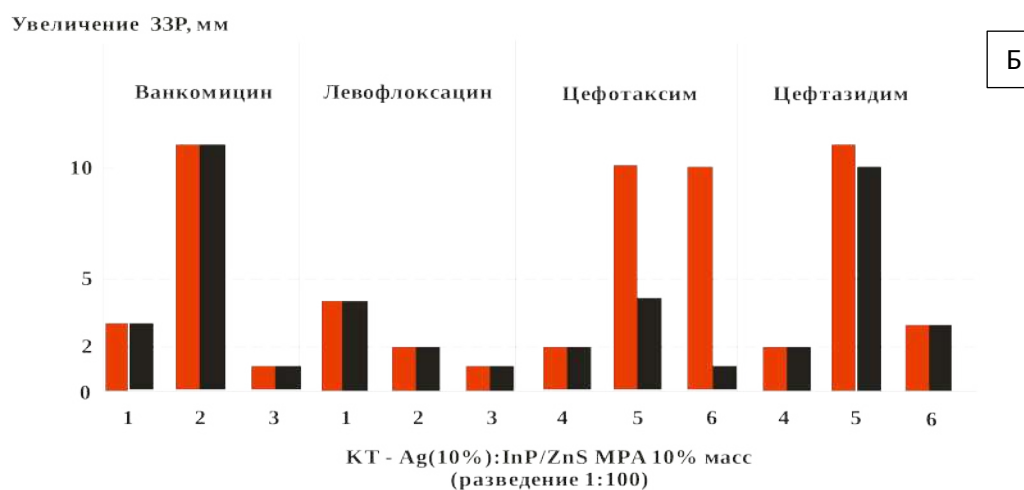
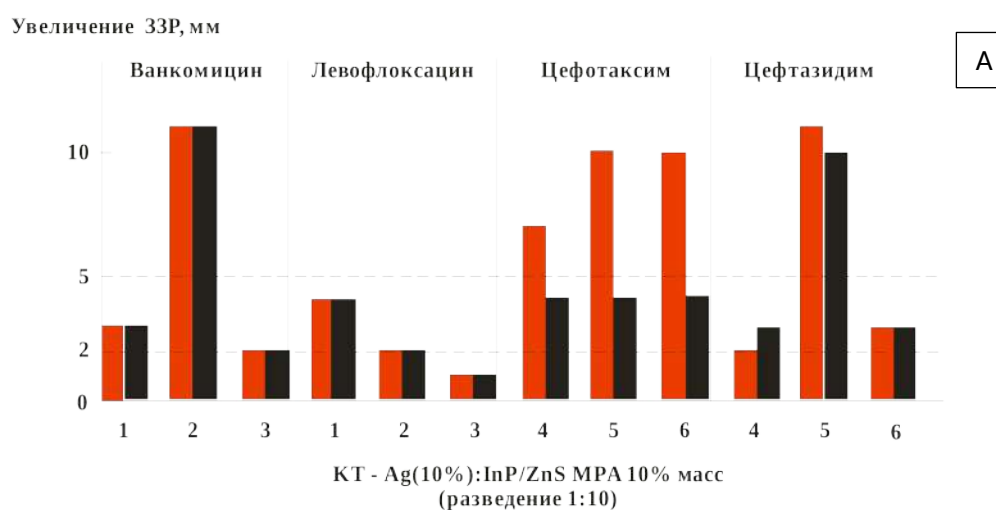


Рисунок 65 – Динамика изменения ЗЗР исследуемых КТ типа InP/ZnSe/ZnS 650 10% масс. в разведении: А – 1:10; Б – 1:100; В – 1:1000



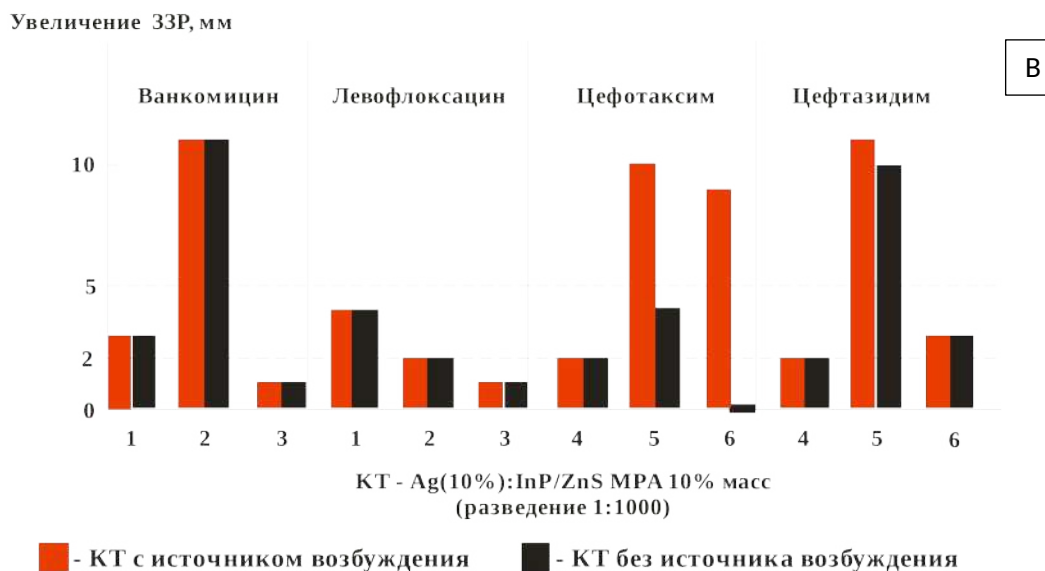


Рисунок 66 – Динамика изменения ЗЗР исследуемых КТ типа Ag(10%):InP/ZnS МРА 10% масс. в разведении: А – 1:10; Б – 1:100; В – 1:1000

Анализ динамики ЗЗР трех типов КТ в различном разведении показал, что 13% исследуемых госпитальных штаммов микроорганизмов, вне зависимости от источника возбуждения и концентрации раствора КТ, имеют динамику ЗЗР в сравнении с АБ очень высокой эффективности (свыше 5 мм), 77% – высокой эффективности (2-5 мм), 6% – умеренной эффективности (до 2 мм), у 4% выявлено отсутствие увеличения ЗЗР ($p \leq 0,05$).

Таким образом, в ходе исследования антибактериальной активности квантовых точек и конъюгатов на их основе посредством бактериологических методов исследования установлено, что исследуемые КТ проявляют антиинфекционную активность в отношении актуальных возбудителей инфекционных заболеваний переднего и заднего отрезков глаза (амбулаторных и госпитальных штаммов в особенности), особенно в отношении синегнойной инфекции, вне зависимости от концентрации (от 1 до 0,01%) и наличия/отсутствия источника возбуждения. Наибольшую эффективность в отношении увеличения ЗЗР значимо продемонстрировали КТ типа Ag(10%):InP/ZnS, что вероятнее всего обусловлено дополнительным ингибирующим воздействием серебра, входящим в структуру КТ ($p \leq 0,05$).

Более 6% исследуемых амбулаторных штаммов микроорганизмов имеют ЗЗР очень высокой эффективности (свыше 5 мм), 69% – высокой эффективности (2-5 мм), 9% – умеренной эффективности (до 2 мм), у 16% выявлено отсутствие увеличения ЗЗР. Более 13% исследуемых госпитальных штаммов микроорганизмов имеют ЗЗР очень высокой эффективности (свыше 5 мм), 77% – высокой эффективности (2-5 мм), 6% – 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.

5.2. Доклиническая эффективность разработанной технологии лечения инфекционного поражения глаза с помощью квантовых точек и конъюгатов на их основе, вызванного антибиотикорезистентной грамотрицательной и грамположительной микрофлорой на лабораторных животных

На данном этапе диссертационной работы исследование шло в следующих направлениях:

- моделирование и разработка экспериментального лечения инфекционного поражения роговицы, вызванного антибиотикорезистентной Гр⁻ микрофлорой;
- моделирование и разработка экспериментального лечения инфекционного поражения роговицы, вызванного антибиотикорезистентной Гр⁺ микрофлорой;
- моделирование и разработка экспериментального лечения инфекционного поражения внутренних оболочек глазного яблока, вызванного антибиотикорезистентной Гр⁻ микрофлорой;

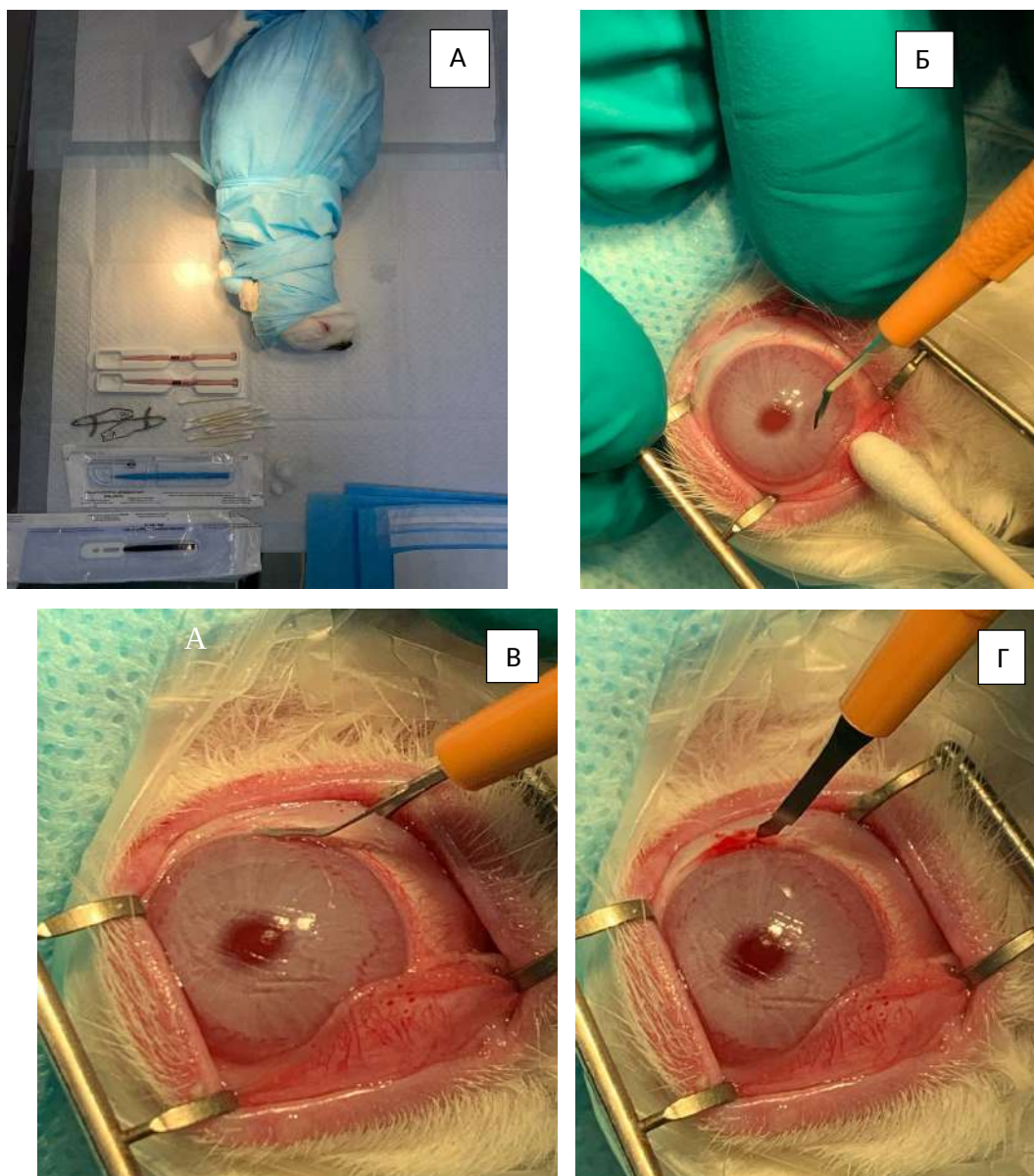
- моделирование и разработка экспериментального лечения инфекционного поражения внутренних оболочек глазного яблока, вызванного антибиотикорезистентной G^- микрофлорой.

Последовательное изложение указанных направлений приведено ниже.

5.2.1. Результаты моделирования и разработки экспериментального лечения инфекционного поражения роговицы, вызванного антибиотикорезистентной грамотрицательной микрофлорой

Эксперимент проводили в условиях операционного блока ветеринарной клиники с офтальмологическим профилем ООО «Здоровье животных», г. Екатеринбург. 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 ($3,8 \pm 0,4$). Первым этапом на правых глазах животных после тугого пеленания и предварительной эпibuльбарной анестезии проксиметакаином гидрохлоридом 0,5 % под операционным микроскопом с соблюдением всех правил асептики инициировали бактериальный кератит унифицированным способом: при помощи ножа, который обычно используется для выполнения основного разреза в хирургии катаракты, производили скарификацию эпителия центральной части роговицы с нанесением тангенциальных разрезов на глубину 2 мм до десцеметовой оболочки. Для дополнительной индукции иммунного ответа в височном секторе на протяжении 3 часовых меридианов выполняли унифицированное вскрытие лимбальной конъюнктивы (Рисунок 67).

В качестве индуктора воспаления была взята культура внутрибольничного штамма синегнойной палочки, выделенной из клинического материала в ГАУЗ СО «Клинико-диагностический центр» г. Екатеринбург.



А – пеленание лабораторного животного

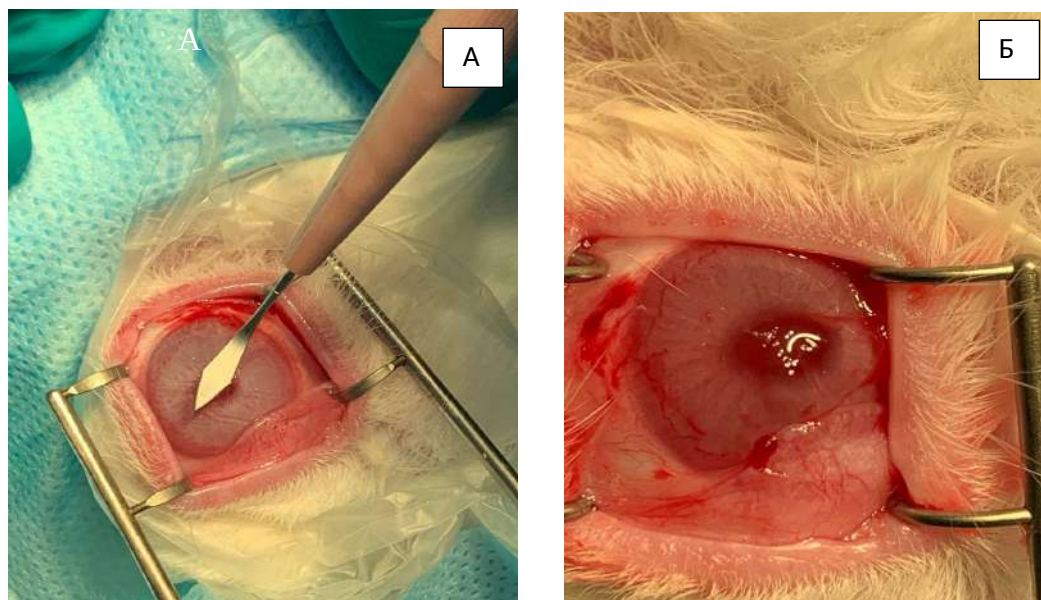
Б – скарификация эпителия

В, Г – вскрытие лимбальной конъюнктивы

Рисунок 67 – Коллаж процесса подготовки лабораторного животного к
индукции бактериального кератита

Предварительное исследование антибиотикочувствительности исследуемого штамма микроорганизма диско-диффузионным методом к антибактериальным препаратам показало отсутствие чувствительности к аминогликозидам и цефалоспорином, ЗЗР не превышала 6 и 8 мм соответственно (микробы считают чувствительными к антибиотику при ЗЗР

15 мм и более). Инокулюм для введения в структуры роговицы соответствовал плотности 0,5 по стандарту МакФарланда и содержал $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл *Ps.aeruginosa*. Контроль оптической плотности суспензии осуществляли денситометрически. После повторного высушивания поврежденной роговицы нож для выполнения основного разреза в хирургии катаракты погружали в инокулюм с последующим контактом со структурами роговицы (Рисунок 68). Просушивание роговицы и конъюнктивальной полости перед нанесением инокулюма выполняли для обеспечения достаточной концентрации микроба при аппликации ножа с повреждёнными участками роговицы.



А – процесс внесения инокулюма в поврежденную роговицу
Б – внешний вид глазного яблока после проведения процедуры контаминации

Рисунок 68 – Этап контаминации лабораторного животного

После процедуры внесения инокулюма животные были рандомно разделены на две группы по 10 кроликов в каждой. Первой группе лабораторных животных после манифестации клинической картины микробного кератита выполняли идентификацию патогенной флоры, вызвавшей процесс в лабораторных условиях (бактериологический посев), и

проводили лечение с помощью инстилляций глазных капель Тобрамицин каждые 2 часа (раствор Т).

Кролики второй группы получали инстиллянии комплекса КТ InP/ZnSe/ZnS 650 и Тобрамицина (комплекс КТ/Т) в том же режиме.

Согласно разработанной технологии лечения, процесс приготовления комплекса с Тобрамицином стандартно заключался в добавлении к 5 мл нативного раствора Тобрамицина раствора КТ InP/ZnSe/ZnS 650 в объеме 1 мл/0,05% мл (для получения концентрации 0,01%). На завершающем этапе стандартно выполняли механическое перемешивание полученной суспензии на лабораторном шейкере.

В промежутки от 8 до 12 часов (в среднем $9,5 \pm 3$ часа) после введения инокулюма *Ps. aeruginosa* у всех лабораторных животных ($n=20$) возникли острые проявления язвенного инфекционного кератоконъюнктивита (Рисунок 69). Этот период явился стартовым для начала проведения антиинфекционной терапии по вышеописанной схеме.

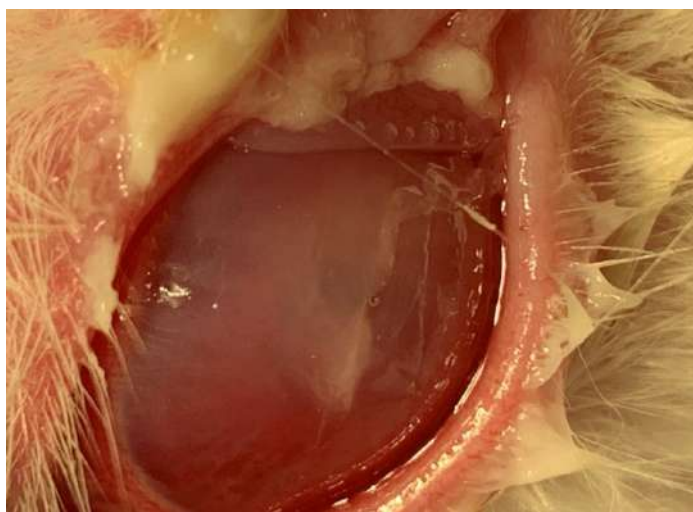


Рисунок 69 – Манифестация клинической картины инфекционного кератоконъюнктивита. Кролик № 4 (8 часов после введения инокулюма с антибиотикорезистентной G^- микрофлорой)

Кролики 1-й группы ($n=10$), получавшие эпibuльбарные инстиллянии Тобрамицина, демонстрировали полное отсутствие положительной клинической динамики за 3-дневный период лечения. С целью анатомической

сохранности глазного яблока с 4-го дня все животные были переведены на инстилляцию комплекса КТ/Т (Рисунок 70).

Кролики 2-й группы, получавшие инстилляцию комплекса КТ/Т, демонстрировали положительную динамику в отношении обратного развития симптомов со 2-го дня терапии (Рисунок 71).

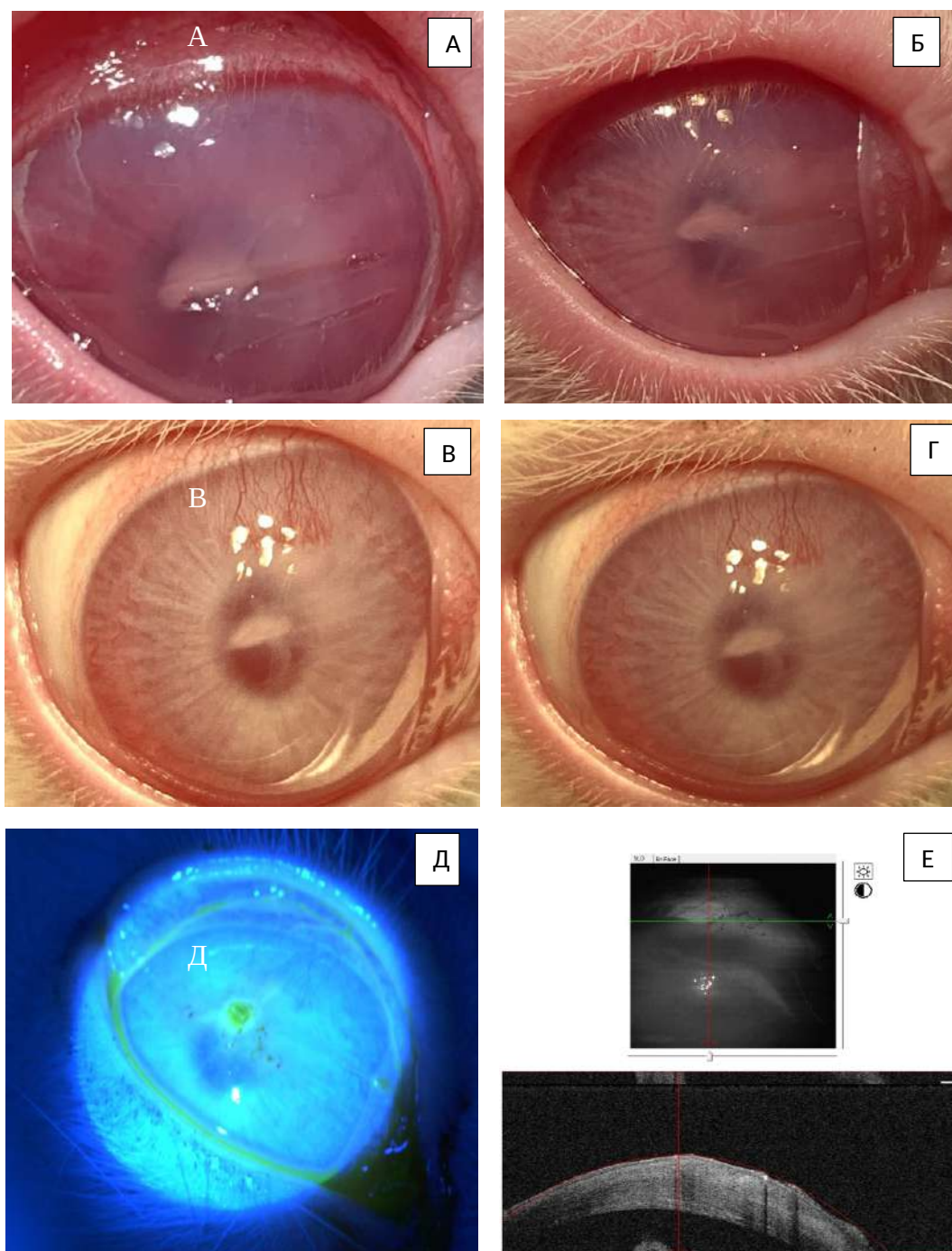


Рисунок 70 – Пример, кролик 1-й группы, получавший эпibuльбарные инстилляциИ Тобрамицина. Коллаж. Динамика регресса клинической симптоматики: А – 5-е сутки, Б – 6-е сутки, В – 7-е сутки, Г – 8-е сутки,

Д – 9-е сутки (окраска флуоресцеином), Е – 9-е сутки лечения (ОКТ
переднего сегмента)

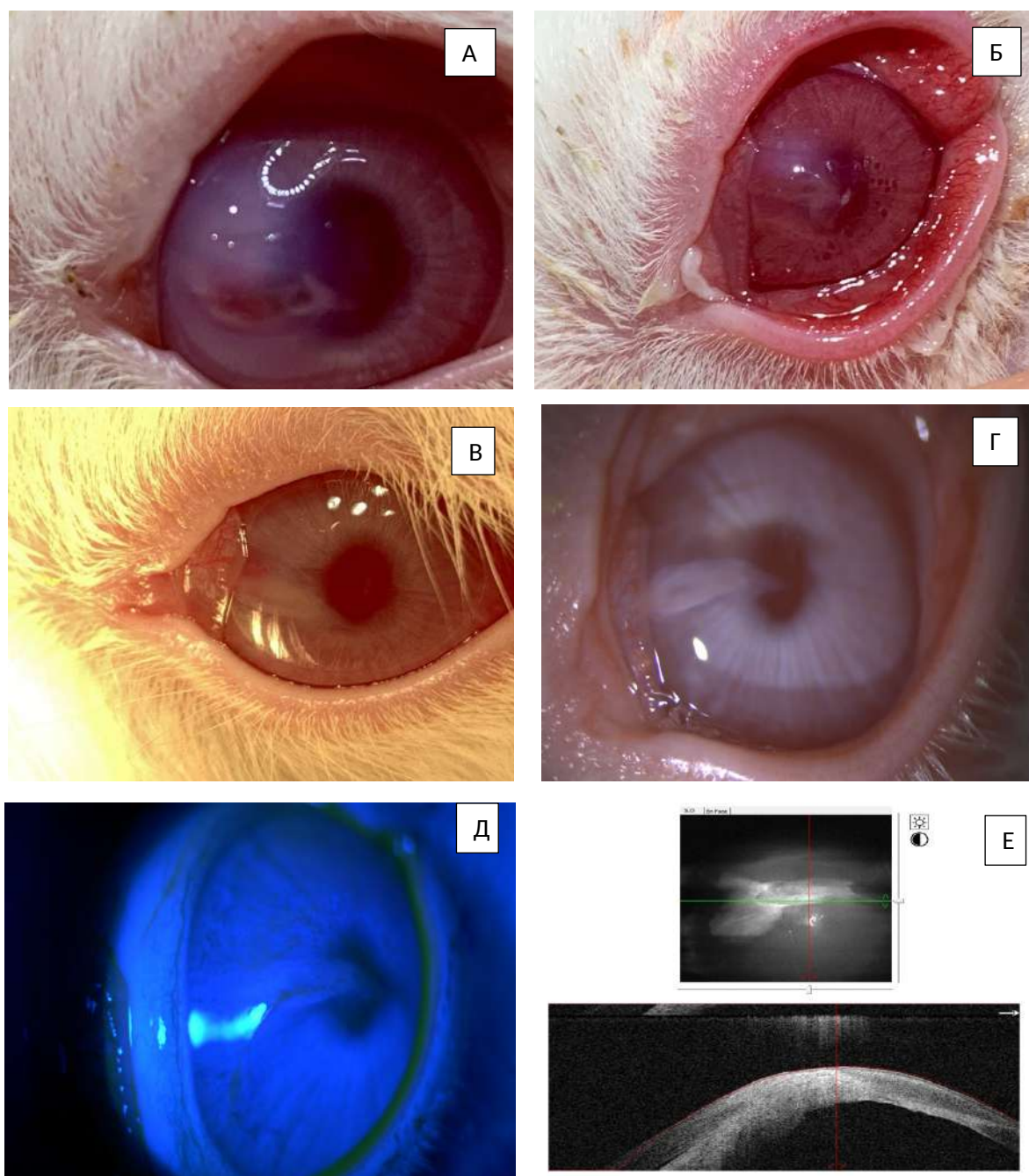


Рисунок 71 – Пример, кролик второй группы, получавший инстилляцию комплекса КТ/Т. Коллаж. Динамика регресса клинической симптоматики:

А – 2-е сутки, Б – 3-е сутки, В – 4-е сутки, Г – 5-е сутки, Д (операция флуоресцеином, Е (ОКТ переднего сегмента) – 6-е сутки лечения

При мониторинге клинической реакции на лечение (применение комплекса на основе антибиотика и квантовых точек) во всех случаях было

выявлено уменьшение периметра и плотности стромального инфильтрата, уменьшение стромального отека и эндотелиальной воспалительной реакции, отсутствие воспалительных клеток в передней камере, практически полная реэпителизация роговицы, отсутствие процессов истончения роговицы. Сравнительная характеристика полученных данных в период наблюдения до 7 суток представлена в Таблицах 25, 26, на Рисунке 72 – данные сравнения полученных результатов.

Таблица 25 – Группа животных № 1, получавших эпibuльбарные инстилляции Тобрамицина. Мониторинг клинической реакции на лечение

Кролик (n)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Признак										
ДПерСИ	1	2	2	2	1	1	1	1	3	2
ДПлСИ	2	1	1	1	3	1	2	2	3	2
ДСО и ЭВР	1	2	2	1	2	1	2	1	3	1
ФТ	2	1	1	2	1	1	2	2	1	2
ДРР	1	2	2	1	1	1	2	3	1	2

Таблица 26 – Группа животных № 2, получавших эпibuльбарные инстилляции конъюгата. Мониторинг клинической реакции на лечение

Кролик (n)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Признак										
ДПерСИ	4	5	5	5	4	5	4	4	5	4
ДПлСИ	4	5	4	5	4	5	5	4	5	5
ДСО и ЭВР	4	3	4	5	4	5	4	4	5	5
ФТ	5	4	4	3	4	4	4	4	5	5
ДРР	5	4	4	4	4	5	4	5	4	5

Примечания: ДПерСИ – динамика периметра стромального инфильтрата; ДПлСИ – динамика плотности стромального инфильтрата; ДСО и ЭВР – динамика стромального отека и эндотелиальной воспалительной реакции; ФТ – наличие воспалительных клеток в передней камере (феномен Тиндаля); ДРР – динамика реэпителизации роговицы, отсутствие или

прекращение процессов истончения роговицы; 1 – низкая динамика, 5 – высокая динамика.

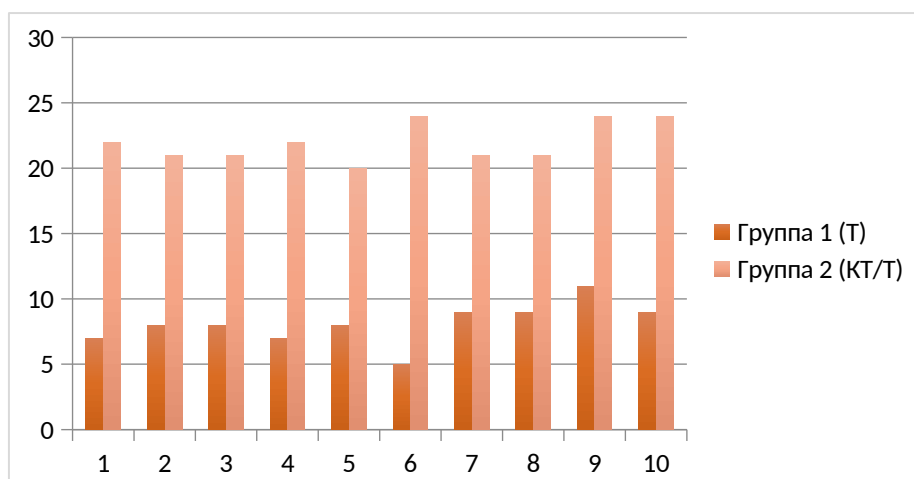


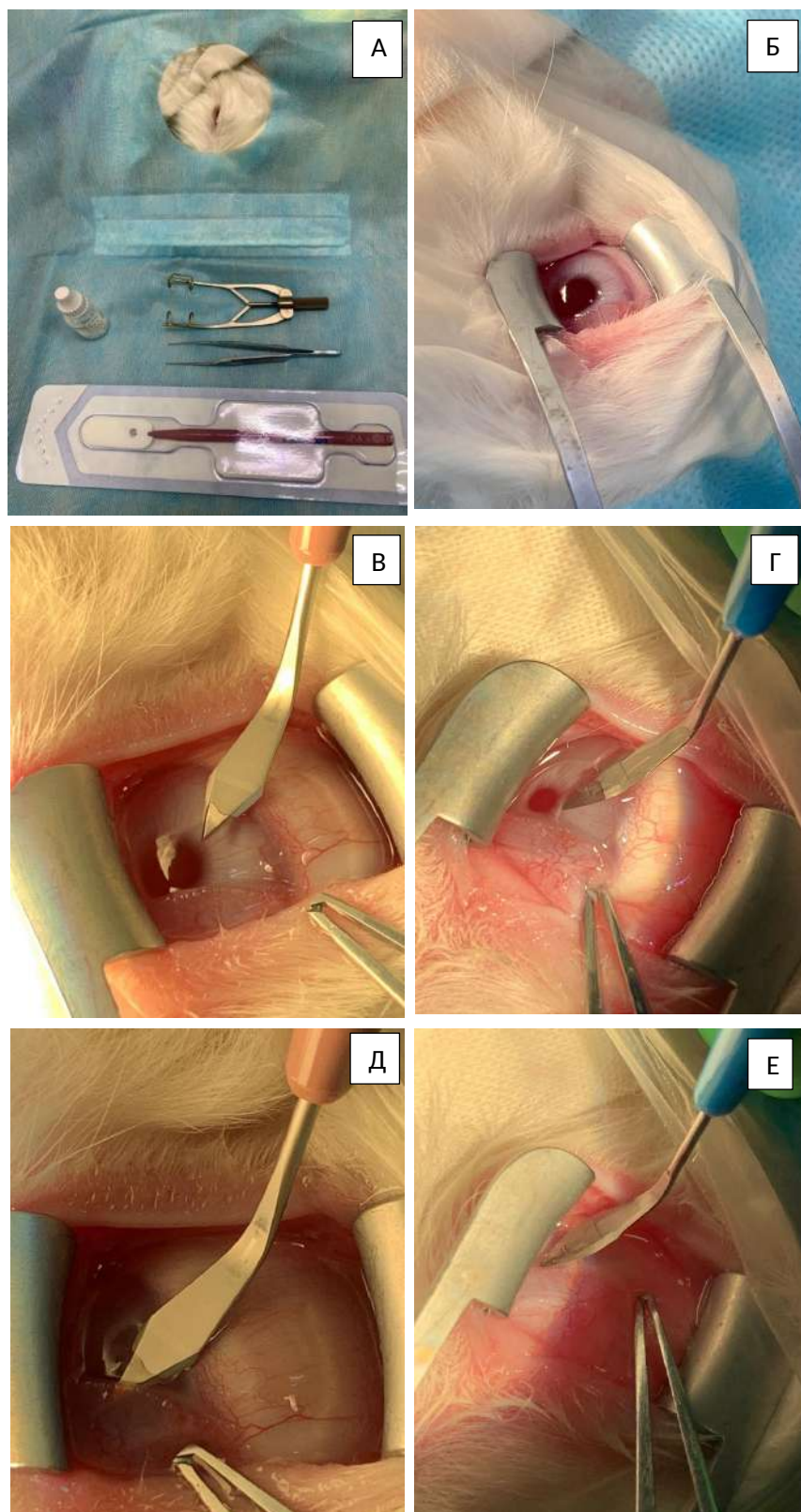
Рисунок 72 – Сравнительная оценка эффективности лечения на основании анализа признаков, где группа 1 – животные, получавшие эпibuльбарные инстилляциИ Тобрамицина; группа 2 – животные, получавшие эпibuльбарные инстилляциИ конъюгата. Ось абсцисс – сумма анализируемых признаков, ось ординат – порядковый номер лабораторного животного

Анализ полученных данных продемонстрировал увеличение эффективности лечения в группе 2 (комплекс КТ/Т) в сравнении с группой 1 (раствор Т) на 120-130% ($p \leq 0,05$).

5.2.2. Результаты моделирования и разработки экспериментального лечения инфекционного поражения роговицы, вызванного антибиотикорезистентной грамположительной микрофлорой

В эксперименте участвовали 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 производили индукцию бактериального кератита путем введения госпитального штамма *S.aureus* (№ 2548), выделенного из зева на территории ГАУЗ СО «Клинико-диагностический центр», г. Екатеринбург, в стро- му

роговицы с помощью микрохирургического ножа (Рисунок 73), по вышеописанной методике.

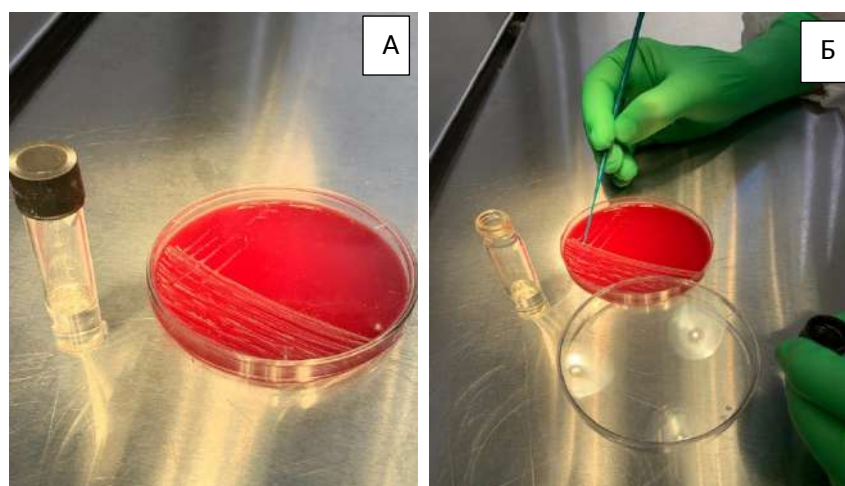


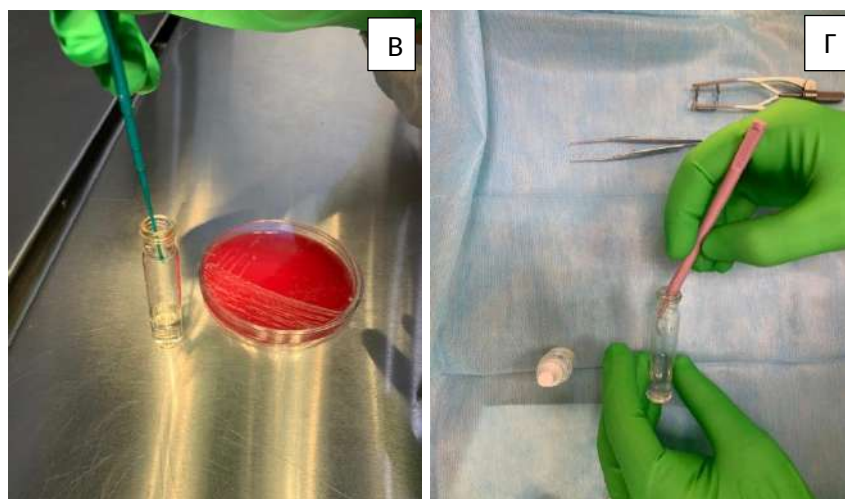
А-Е – этапы процесса внесения инокуляма в структуры роговицы

Рисунок 73 – Поэтапный процесс введения инокуляма в роговицу
подопытных животных

Предварительное исследование антибиотикочувствительности исследуемого штамма микроорганизма к антибактериальным препаратам, а также к конъюгату на основе КТ диско-диффузионным методом проводили на базе ГАУЗ СО «Клинико-диагностический центр», г. Екатеринбург. Для приготовления суспензии исследуемых микроорганизмов (инокулюма) использовали стандартный инокулюм, соответствующий по плотности 0,5 по стандарту МакФарланда и содержащий $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл *S.aureus*. Контроль оптической плотности суспензии осуществляли спектрофотометрически (денситометрически). Инокулюм использовали в течение 1-3 мин после приготовления. Нож для основного разреза погружали в инокулюм с последующим введением в структуры роговицы (Рисунок 74).

В качестве противомикробных средств были использованы: раствор Левофлоксацина 5 мл для эпibuльбарного применения (раствор Л) и конъюгат на основе КТ CdTe/Cd МРА 710 и Левофлоксацина (раствор КТ/Л). Методика подготовки раствора КТ/Л заключалась в добавлении к 5 мл нативного раствора Левофлоксацина раствора КТ CdTe/Cd МРА 710 в объеме 1 мл/0,05%, (для получения концентрации 0,01%). На завершающем этапе выполняли механическое перемешивание полученной суспензии на лабораторном шейкере (Рисунок 75).





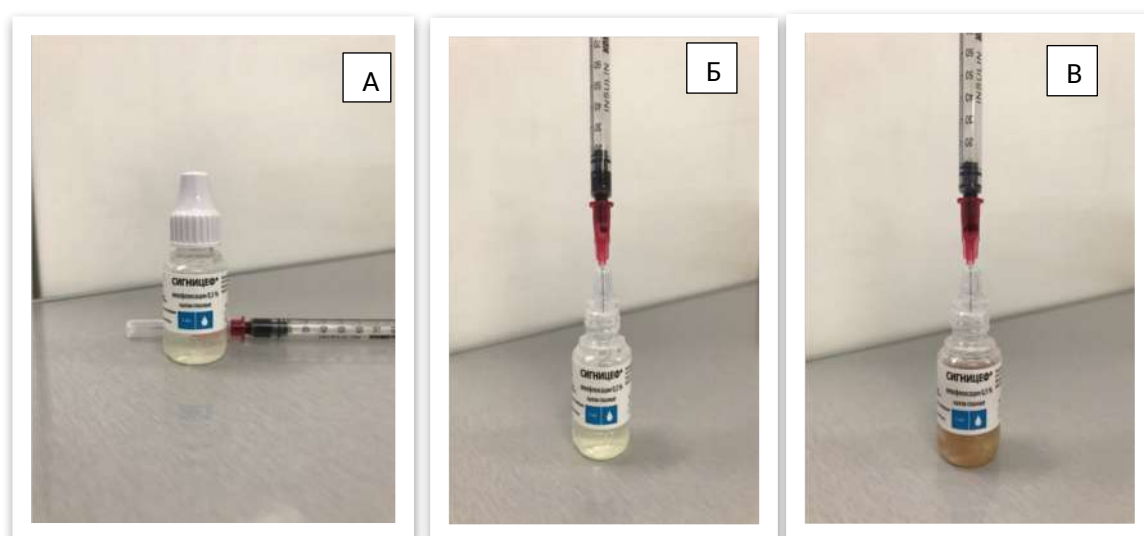
А – инокулюм

Б – процесс взятия инокулюма

В – внесение инокулюма в среду

Г – погружение ножа в инокулюм

Рисунок 74 – Поэтапный процесс подготовки инокулюма для введения в структуры роговицы



■ А – раствор АБ

Б – этап внесения КТ

В – раствор после внесения КТ

Рисунок 75 – Процесс приготовления конъюгата на основе КТ и Левофлоксацина

Завершение подготовительного этапа заключалось в разделении лабораторных животных на две группы по 10 кроликов в каждой. Кролики 1-й группы после манифестации клинической картины бактериального кератита и идентификации возбудителя лабораторным методом получали инстилляцию капель Левофлоксацина в конъюнктивальный мешок каждые 2 часа на протяжении 7 дней, кролики 2-й группы, придерживаясь аналогичной схемы лечения, получали инстилляцию конъюгата.

На 1-е сутки после введения инокулюма в строму роговицы правых глаз лабораторных животных клинические проявления инфильтрации роговицы во всех случаях отсутствовали.

На 2-е сутки наблюдения у всех лабораторных животных (n=20) были выявлены клинические признаки бактериального кератита, которые сопровождались гиперемией и инфильтрацией роговицы в месте ее индуцированного повреждения (Рисунок 76). Этот период явился стартовым для начала проведения антиинфекционной терапии по вышеописанной схеме.



Рисунок 76 – Пример инфильтрации роговицы лабораторного животного в результате индукции бактериального кератита антибиотикорезистентной G^+ микрофлорой на 2-е сутки динамического наблюдения

На 3-и сутки динамического наблюдения у лабораторных животных 2-й группы, получавших конъюгат, был выявлен значительный регресс

клинических проявлений, который проявлялся в уменьшении площади и интенсивности инфильтрации роговицы в сравнении с 1-й группой лабораторных животных, получавших инстилляцию Левофлоксацина (Рисунок 77).

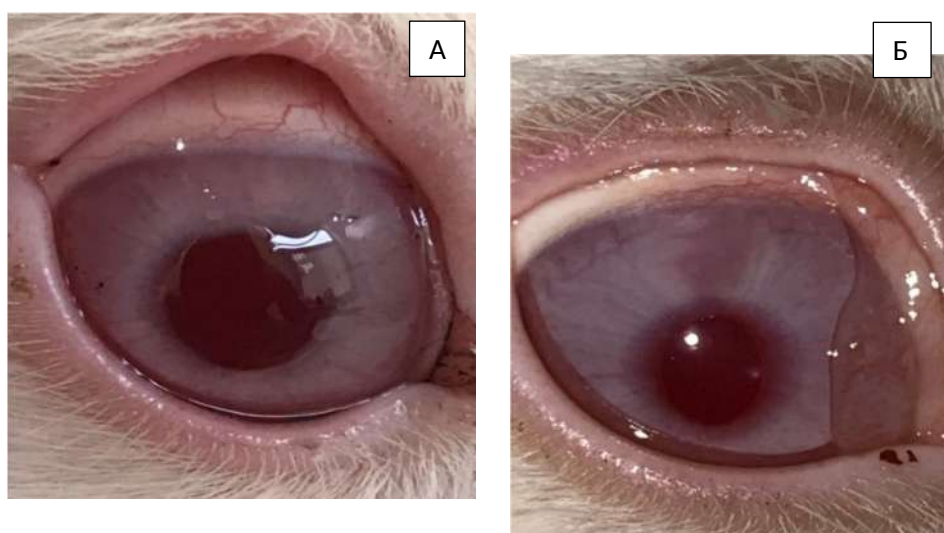


Рисунок 77 – Пример роговицы лабораторных животных, получавших растворы КТ/Л (А) и Л (Б) на 3-и сутки динамического наблюдения

Начиная с 4-х суток динамического наблюдения за лабораторными животными, во 2-й группе кроликов, получавших КТ/Л, был выявлен полный регресс клинической симптоматики со стороны роговицы – полная резорбция инфильтрата с ограниченной остаточной «облаковидной запыленностью». В 1-й группе кроликов, получавших инстилляцию Левофлоксацина, значительной положительной динамики в отношении обратного развития симптомов выявлено не было (Рисунок 78).

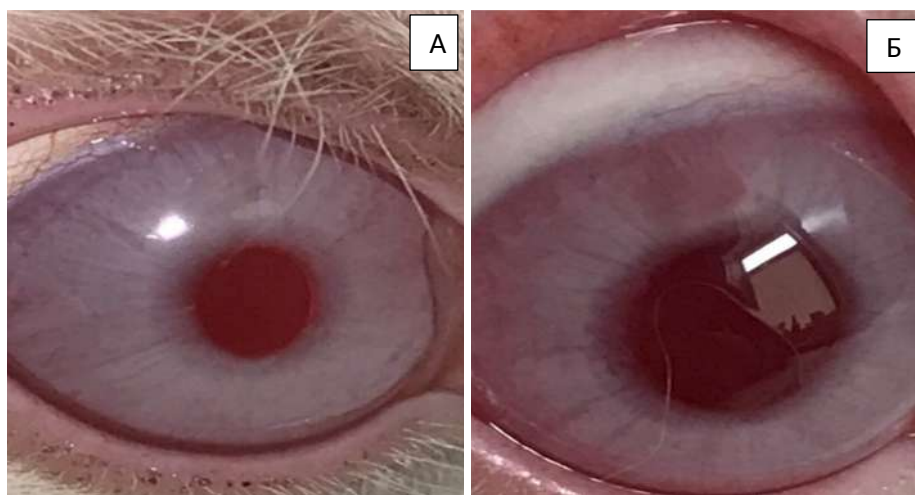
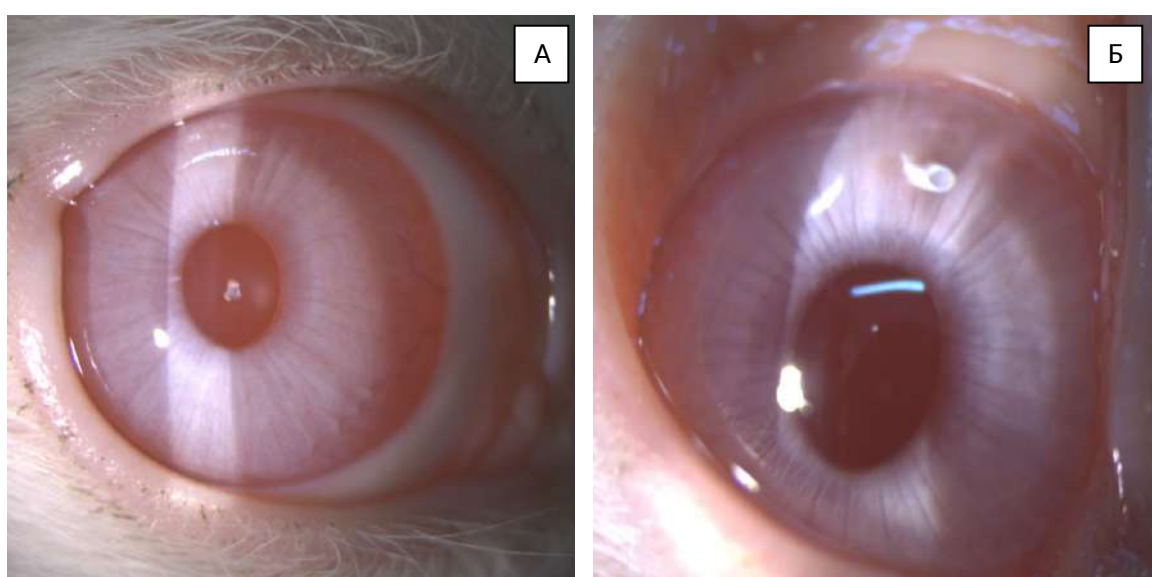


Рисунок 78 – Пример роговицы лабораторных животных, получавших растворы КТ/Л (А) и Л (Б) на 4-е сутки динамического наблюдения

Примеры, заключительного, седьмого дня лечения и динамического наблюдения представлены на Рисунке 79, из которого видно, что лабораторные животные, получавшие конъюгат на основе КТ, не имеют клинических проявлений бактериального кератита, в отличие от группы животных, получавших инстилляции Левофлоксацина. Во 2-й группе визуализируется роговичный инфильтрат, с локальным эпителиальным дефектом, прокрашиваемым флуоресцеином.



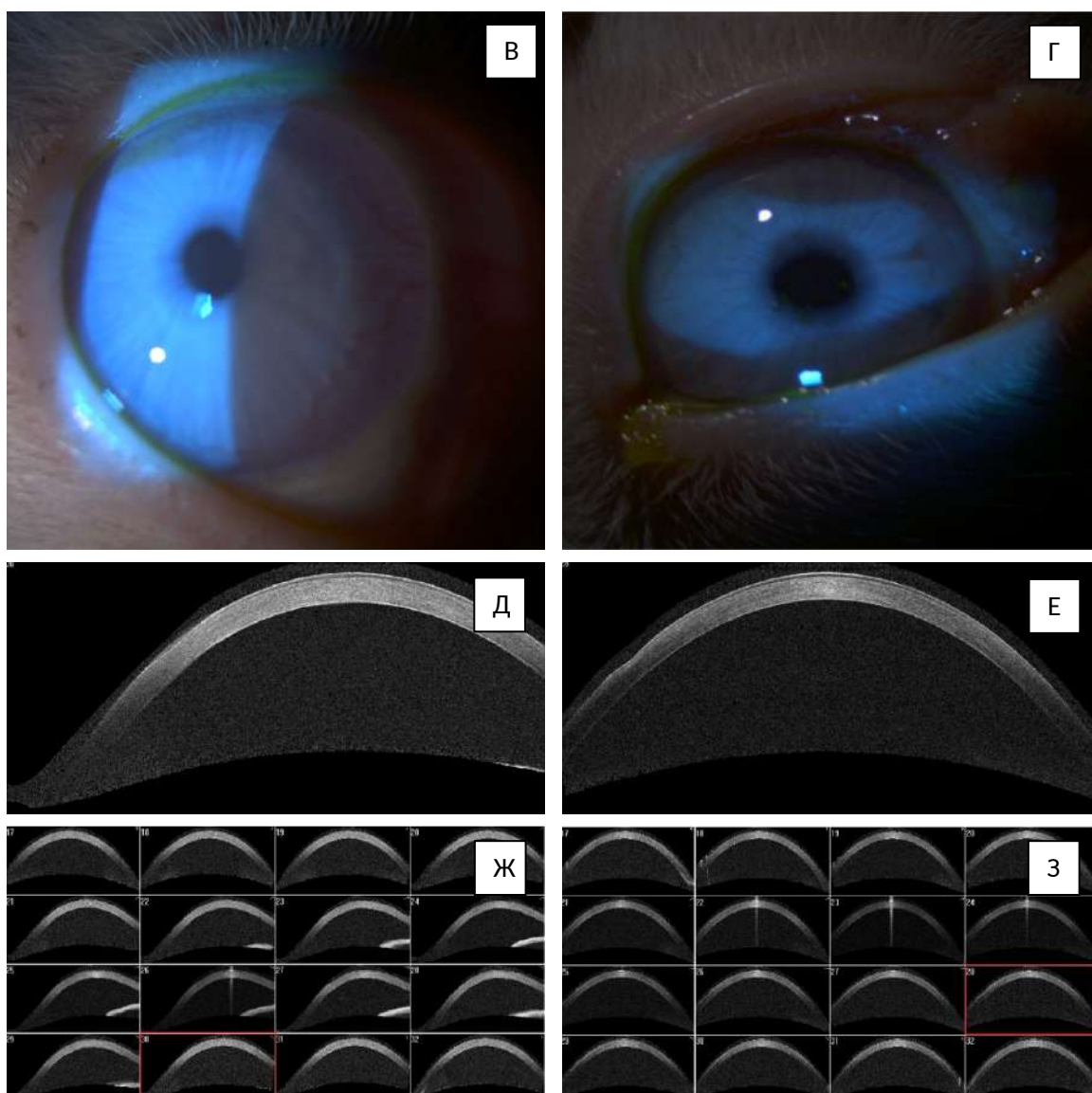


Рисунок 79 – Пример роговицы и ОКТ переднего отрезка лабораторных животных, получавших КТ/Л (левый столбец – А, В, Д, Ж) и Л (правый столбец – Б, Г, Е, З) на 7-е сутки динамического наблюдения

Сравнительная характеристика полученных данных в сроки наблюдения до 7 суток представлена в Таблицах 27, 28, на Рисунке 80 – данные сравнения полученных результатов.

Таблица 27 – Группа животных № 1, получавших эпibuльбарные инстилляции Левофлоксацина. Мониторинг клинической реакции на лечение

Кролик (n)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Признак										
ДПерСИ	2	1	1	3	3	2	2	1	2	1
ДПлСИ	1	1	2	3	2	3	3	2	2	2
ДСО и ЭВР	2	1	1	2	1	1	2	2	2	3
ФТ	1	2	3	2	1	2	3	2	2	2
ДРР	2	3	3	3	2	2	1	1	3	1

Таблица 28 – Группа животных № 2, получавшие эпibuльбарные инстилляции конъюгата. Мониторинг клинической реакции на лечение

Кролик (n)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Признак										
ДПерСИ	5	3	3	4	4	4	5	5	4	4
ДПлСИ	4	3	5	5	5	5	5	4	5	5
ДСО и ЭВР	5	5	5	4	4	5	4	5	5	4
ФТ	4	5	5	3	5	4	3	4	4	5
ДРР	4	5	4	5	4	5	4	5	4	5

Примечания: ДПерСИ – динамика периметра стромального инфильтрата; ДПлСИ – динамика плотности стромального инфильтрата; ДСО и ЭВР – динамика стромального отека и эндотелиальной воспалительной реакции; ФТ – наличие воспалительных клеток в передней камере (феномен Тиндаля); ДРР – динамика реэпителизации роговицы, отсутствие или прекращение процессов истончения роговицы; 1 – низкая динамика, 5 – высокая динамика.

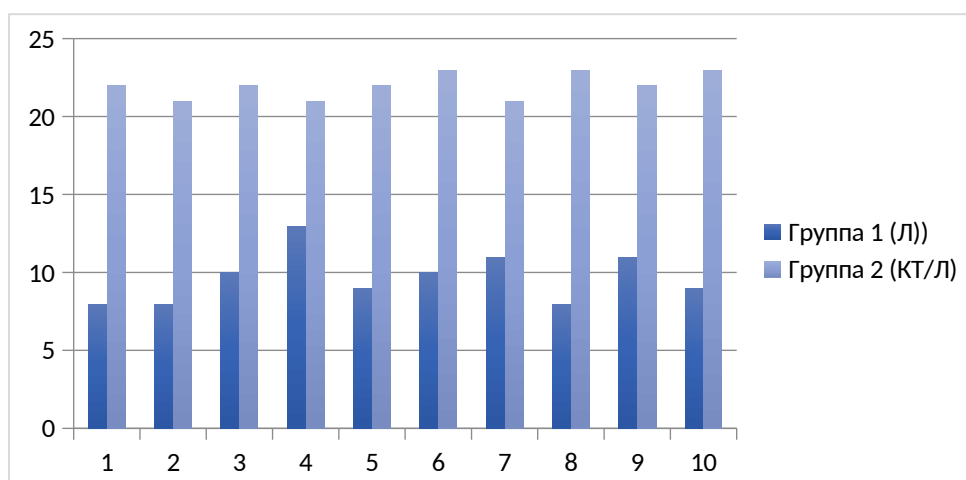


Рисунок 80 – Сравнительная оценка эффективности лечения на основании анализа признаков: группа 1 – животные, получавшие эпibuльбарные инстилляциИ Левофлоксацина; группа 2 – животные, получавшие эпibuльбарные инстилляциИ конъюгата. Ось абсцисс – сумма анализируемых признаков, ось ординат – порядковый номер лабораторного животного

Анализ полученных данных продемонстрировал увеличение эффективности лечения в группе, получавшей конъюгат КТ/Л в сравнении с группой, получавшей раствор Л на 110-120% ($p \leq 0,05$).

5.2.3. Результаты моделирования и разработки экспериментального лечения инфекционного поражения внутренних оболочек глазного яблока, вызванного антибиотикорезистентной грамотрицательной микрофлорой

Эксперимент проводили на лабораторных Новозеландских кроликах ($n=27$), мужского пола в возрасте от 3,0 до 3,5 мес. (в среднем $3,2 \pm 1,5$), весом от 3,5 до 4,0 кг (в среднем $3,7 \pm 0,34$).

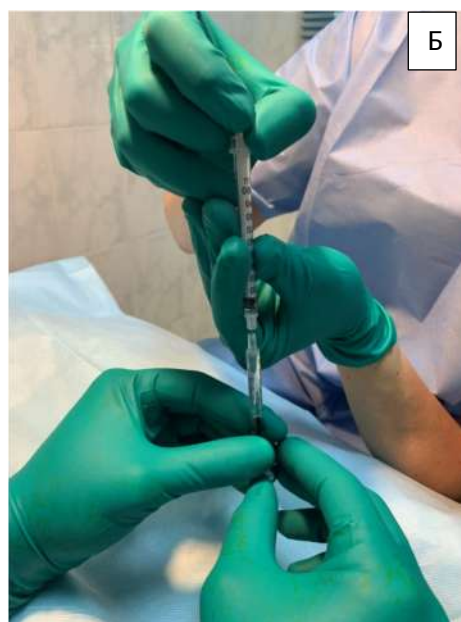
Животные содержались в условиях вивария в Научно-исследовательском институте Фтизиопульмонологии, г. Екатеринбург. После заражения условия содержания лабораторных животных менялись в соответствии с условиями работы при заражении особо-опасными

инфекциями. Лабораторные животные содержались в изолированных боксах с приточно-вытяжной вентиляцией (Рисунок 81).



Рисунок 81 – Боксы для содержания лабораторных животных с централизованной системой приточно-вытяжной вентиляции

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 стандарту МакФарланда (Рисунок 82), выделенной от пациента с септическим поражением на базе ГАУЗ СО «Клинико-диагностический центр», г. Екатеринбург. Предварительные данные лабораторного анализа на чувствительность к антибактериальным препаратам соответствовали штамму с множественной лекарственной устойчивостью (Рисунок 83).



А – набор инструментов

Б – забор культуры

В – операционное поле

Г – введение культуры

Рисунок 82 – Процесс интравитреального введения инокулюма синегнойной палочки лабораторным животным

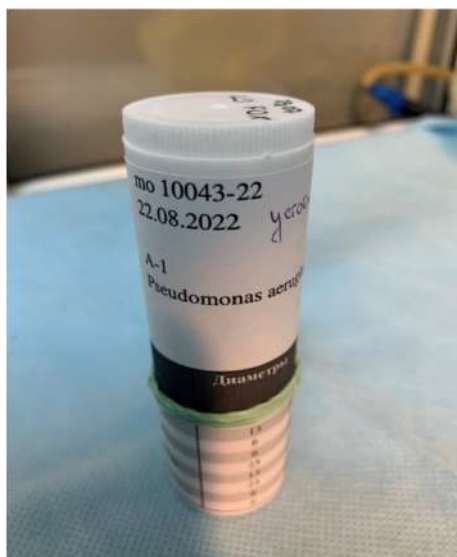


Рисунок 83 – Транспортировочный бокс для выделенной синегнойной инфекции

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

1-я группа (n=3) – ИВВ раствора Ag(10%):InP/ZnS МРА 0,1 мл в стандартной 10% концентрации;

2-я группа (n=3) – ИВВ раствора Ag(10%):InP/ZnS МРА в 100-кратном разведении (0,1%);

3-я группа (n=3) – ИВВ раствора Ag(10%):InP/ZnS МРА в 1000-кратном разведении (0,01%);

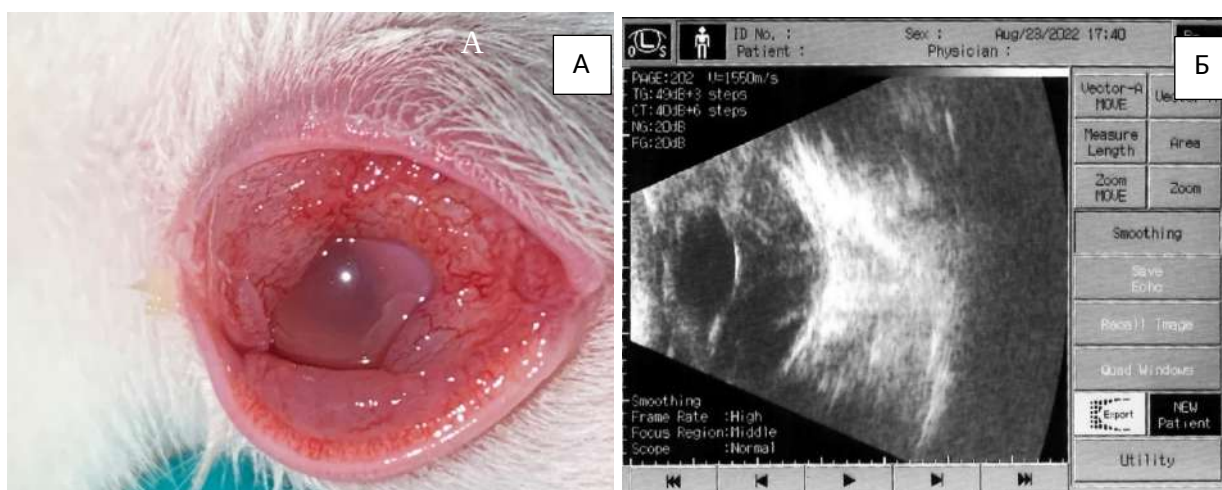
4-я группа (n=3) – ИВВ раствора Ag(10%):InP/ZnS МРА 0,05 мл в стандартной 10% концентрации, в сочетании с 2,25 мг/0,05 мл Цефтазидима (стандартного АБ, имеющего потенциальную активность в отношении Гр⁻ микрофлоры, к которой относится синегнойная инфекция) – Конъюгат № 1;

5-я группа (n=3) – ИВВ 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) – ИВВ раствора Ag(10%):InP/ZnS МРА 0,05 мл в 1000-кратном разведении (0,01%), в сочетании с 2,25 мг/0.05 мл Цефтазидима – Конъюгат № 3;

7, 8, 9-я группы (n=9) – получали интравитреальную инъекцию 2,25 мг/0,1 мл Цефтазидима в качестве контроля.

На 1-е сутки после внесения инокулюма *Ps. aeruginosa* в витреальную полость у всех лабораторных животных (n=27) были выявлены признаки острого бактериального эндофтальмита, которые сопровождались интенсивной гиперрефлективной воспалительной взвесью в витреальной полости по данным ультразвуковой сонографии, отсутствием рефлекса (невозможность визуализации) глазного дна; в передней камере визуализировался гипопион разной интенсивности от 0,5 до 1,5 мм; интенсивность воспалительной реакции в передней камере варьировала от 1 до 3 по воспалительному феномену Тиндаля; отек роговицы варьировал от локального до диффузного, практически во всех случаях наблюдались явления отека конъюнктивы глазного яблока с патологическим отделяемым, смешанная инъекция (Рисунок 84).



А – фото переднего отрезка

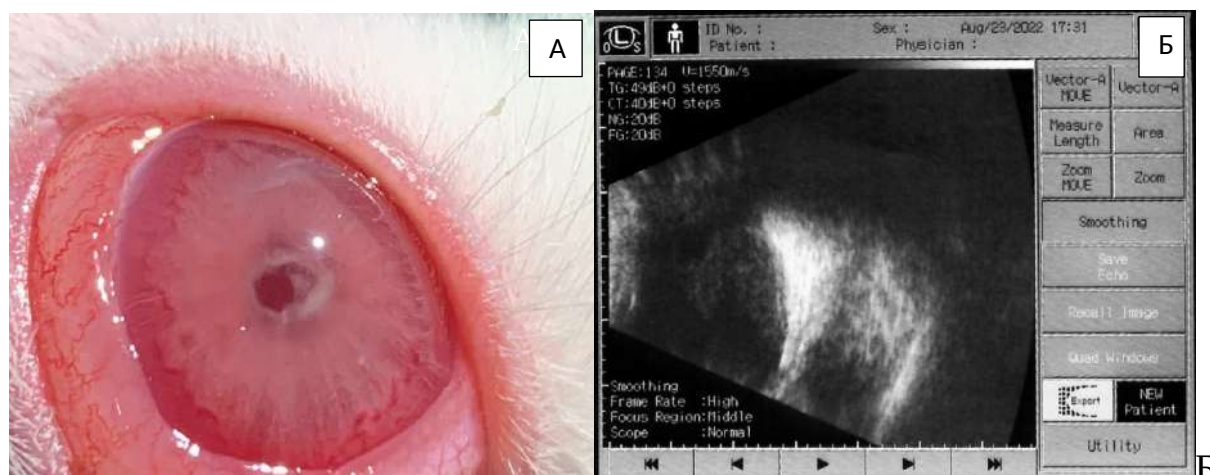
Б – УЗИ

Рисунок 84 – Пример состояния переднего отрезка глаза лабораторного животного и витреальной полости на 1-е сутки после манифестации патологического процесса

На основании полученных результатов животные были разделены на три группы в зависимости от выраженности клинических проявлений и скорости регресса симптоматики:

группа 1 – кролики из 7, 8, 9-й групп (n=9), получившие интравитреальную инъекцию 2,25 мг/0,1 мл Цефтазидима, характеризовались наименьшей динамикой в отношении обратного развития симптомов на протяжении 7-дневного периода наблюдения.

У животных данной группы во всех случаях присутствовали отек роговицы и конъюнктивы, смешанная инъекция глазного яблока, полнокровие сосудов радужной оболочки, экссудативная пленка в передней камере, остатки гипопиона в некоторых случаях, гиперрефлективная взвесь в витреальной полости со слабым рефлексом глазного дна (Рисунок 85).



А – фото переднего отрезка

Б – УЗИ

Рисунок 85 – Состояние переднего отрезка и витреальной полости у лабораторного животного группы 1, через 7 дней динамического наблюдения, получившего интравитреальную инъекцию 2,25 мг/0,1 мл Цефтазидима

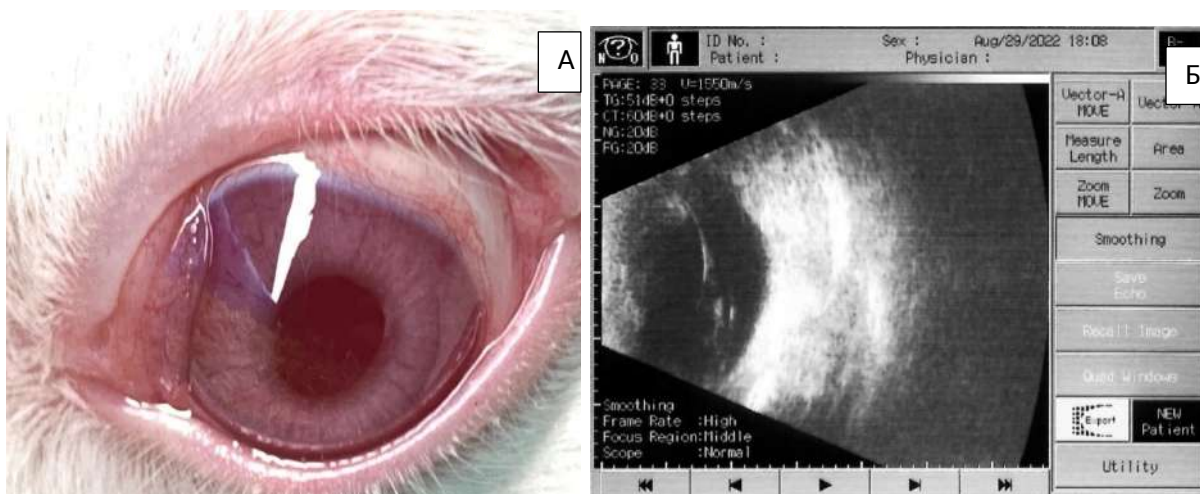
Результаты мониторинга динамики обратного развития симптомов представлены в Таблице 29, по шкале от 1 до 5, где 1 – низкая динамика, 5 – высокая.

Таблица 29 – Результаты мониторинга динамики обратного развития симптомов у кроликов группы 1 (n=9)

Кролик (n)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Признак									
Гипопион	4	4	4	4	4	3	5	4	4
Феномен Тиндаля	2	2	2	3	3	2	2	2	1
УЗИ	1	2	1	1	2	1	1	1	1
Радужка	2	2	3	2	2	1	3	3	2
Роговица	3	2	2	2	2	3	2	2	2

группа 2 – кролики из 1, 2, 3-й групп (n=9), получившие интравитреальные инъекции Ag(10%):InP/ZnS МРА 0,1 мл в стандартной 10% концентрации, 0,1% и 0,01% концентрациях, характеризовались умеренной положительной динамикой в отношении обратного развития симптомов на протяжении 7-дневного периода наблюдения.

У некоторых животных данной группы (2 из 9) присутствовал локальный отек роговицы, практически полностью отсутствовала смешанная инъекция глазного яблока (1 из 9), полнокровие сосудов радужной оболочки было выявлено в 3 случаях из 9, экссудативная пленка в передней камере, признаки гипопиона не были выявлены ни у одного животного, гиперрефлексивная взвесь в витреальной полости со слабым рефлексом глазного дна присутствовала в 7 случаях из 9 (Рисунок 86).



А – фото переднего отрезка

Б – УЗИ

Рисунок 86 – Состояние переднего отрезка и витреальной полости у лабораторного животного группы 2, через 7 дней динамического наблюдения, получившего интравитреальную инъекцию раствора Ag(10%):InP/ZnS МРА в 100-кратном разведении (0,1%)

Результаты мониторинга динамики обратного развития симптомов у лабораторных животных группы 2 представлены в Таблице 30, по шкале от 1 до 5, где 1 – низкая динамика, 5 – высокая.

Таблица 30 – Результаты мониторинга динамики обратного развития симптомов у кроликов группы 2 (n=9)

Кролик (n)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Признак									
Гипопион	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Феномен Тиндаля	5	5	5	4	5	5	5	4	4
УЗИ	3	4	3	5	5	2	3	3	4
Радужка	3	3	3	5	5	5	5	5	4
Роговица	5	5	3	3	5	4	4	5	5

группа 3 – кролики из 4, 5, 6-й групп (n=9), получившие интравитреальные инъекции Ag(10%):InP/ZnS МРА 0,1 мл в стандартной 10%

концентрации, 0,1% и 0,01% концентрациях, в сочетании с 2,25 мг/0,05 мл Цефтазидима (конъюгаты № 1, 2, 3) характеризовались наилучшей положительной динамикой в отношении обратного развития симптомов на протяжении 7-дневного периода наблюдения.

Патологические проявления со стороны роговицы и передней камеры отсутствовали в всех случаях, радужная оболочка характеризовалась нормальным сосудистым рисунком, гиперрефлективная взвесь в витреальной полости патологического характера была выявлена лишь в 1 случае из 9.

Результаты мониторинга динамики обратного развития симптомов у лабораторных животных группы 3 представлены в Таблице 31, по шкале от 1 до 5, где 1 – низкая динамика, 5 – высокая.

Таблица 31 – Результаты мониторинга динамики обратного развития симптомов у кроликов группы 3 (n=9)

Кролик (n)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Признак									
Гипопион	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Феном Тиндаля	5	5	5	5	5	5	5	5	5
УЗИ	5	5	4	5	5	4	5	5	5
Радужка	5	4	4	5	5	5	5	5	5
Роговица	5	5	4	5	5	4	5	5	5

Сравнительная характеристика результатов обратного развития симптомов у исследуемых групп представлена на Рисунке 87.

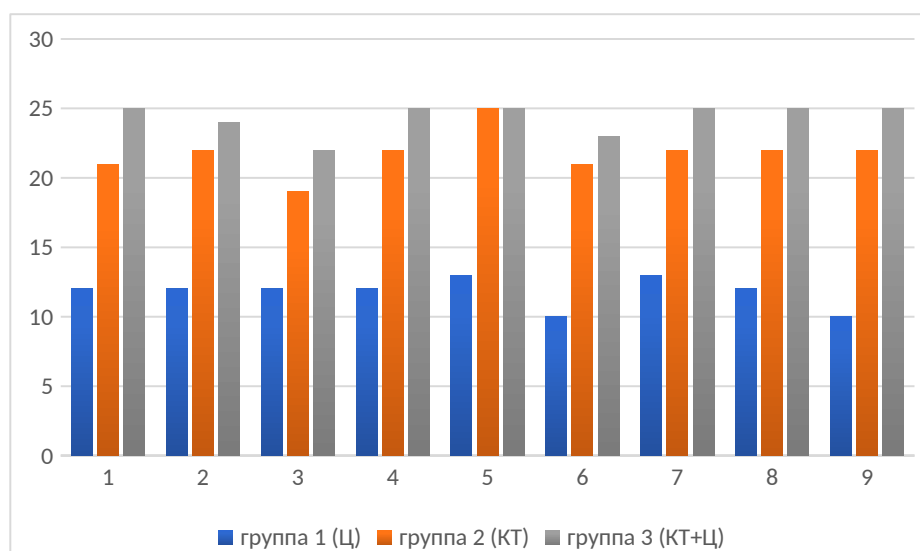


Рисунок 87 – Сравнительная характеристика результатов обратного развития симптомов, на основании суммарного анализа исследуемых признаков у лабораторных животных

Анализ полученных данных продемонстрировал увеличение эффективности лечения в группе 2 (КТ) в сравнении с группой 1 (Ц) на 85-90% и порядка 100% в группе 3 (КТ/Ц) в сравнении с группой 1 (Ц) ($p \leq 0,05$).

5.2.4. Результаты моделирования и разработки экспериментального лечения инфекционного поражения внутренних оболочек глазного яблока, вызванного антибиотикорезистентной грамположительной микрофлорой

Эксперимент проводили в условиях операционного блока ветеринарной клиники с офтальмологическим профилем ООО «Здоровье животных», г. Екатеринбург. 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 $3,7 \pm 1,21$). Первым этапом, на правых глазах животных после тугого пеленания и предварительной эпибульбарной анестезии проксиметакаином гидрохлоридом 0,5% под операционным

микроскопом с соблюдением всех правил асептики инициировали острый бактериальный эндофтальмит, путем интравитреального введения 0,05 мл культуры инфекционного агента (Рисунок 88).

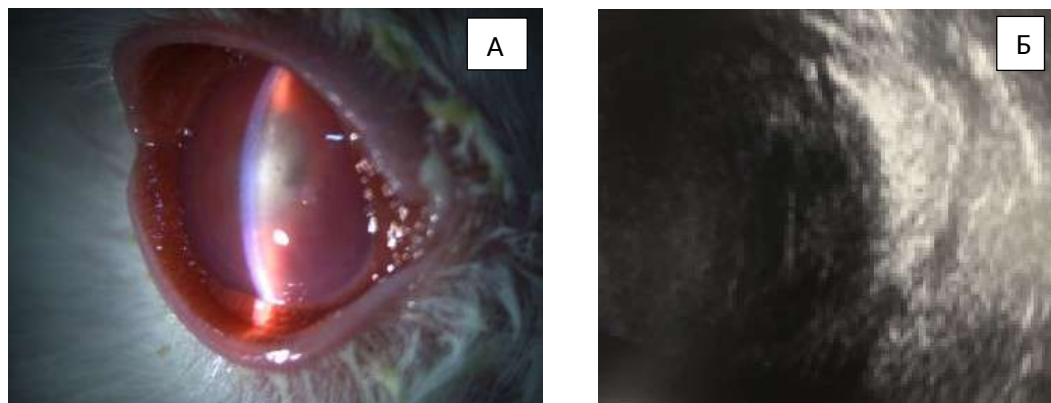


Рисунок 88 – Этап интравитреального введения культуры инфекционного агента

В качестве индуктора воспаления была взята культура внутрибольничного штамма метициллин-резистентного золотистого стафилококка (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. Инокулом для введения в витреальную полость соответствовал мутности 0,5 по стандарту МакФарланда и содержащий $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл МРЗС. Контроль суспензии осуществляли денситометрическим методом.

Животные рандомно были разделены на две 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 (КТ/В), методика приготовления которых подробно описана в предыдущих этапах диссертационного исследования. Кролики второй группы получали ИВВ 1 мг/0,1 мл Ванкомицина (В).

У всех лабораторных животных (n=20) выраженные клинические проявления острого бактериального эндофтальмита возникли на 1-е сутки после интравитреального введения инокулюма *St. aureus* – массивная гиперрефлективная взвесь в витреальной полости, гипопион, отек и преципитаты на эндотелии роговицы, смешанная конъюнктивальная инъекция с патологическим отделяемым (Рисунок 89).



А – фото переднего отрезка

Б – УЗИ

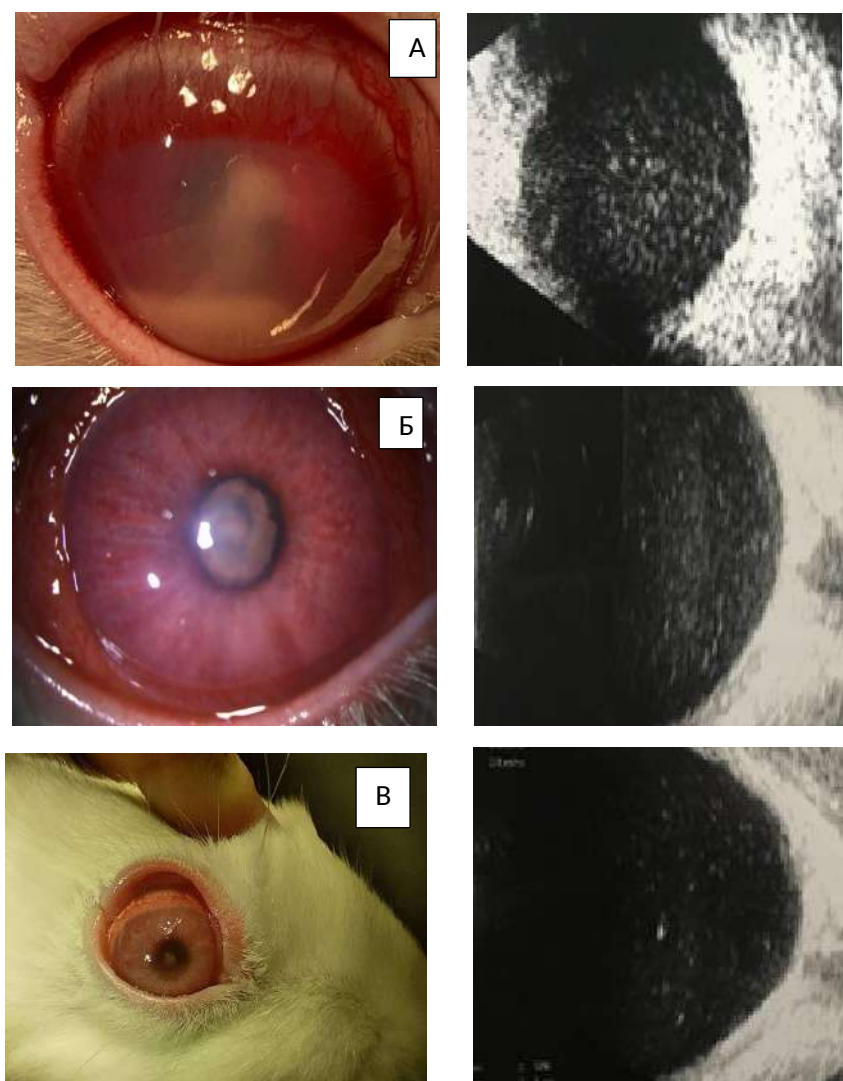
Рисунок 89 – Фото переднего отрезка и УЗИ лабораторного кролика на первые сутки после постановки диагноза эндофтальмит

В течение 60 минут после постановки диагноза всем лабораторным животным были выполнены однократные интравитреальные инъекции вышеописанных антиинфекционных агентов.

В качестве антиинфекционных агентов кроликам 1-й 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 ИВВ 1 мг/0,1 мл Ванкомицина.

Начиная со 2-х суток после ИВВ, у кроликов 1-й группы была отмечена положительная динамика, которая заключалась в исчезновении гипопиона, уменьшении отека роговицы, уменьшении фибринозного выпота в передней камере, исчезновении преципитатов, положительной динамике в отношении

регресса патологического выпота в витреальной полости. Последующее ежедневное наблюдение на протяжении 1 недели демонстрировало постепенный регресс клинических проявлений (Рисунок 90), за исключением остаточной фибринозной пленки по зрачковому краю и локального рубеоза радужной оболочки.



А – 1-е сутки после манифестации патологического процесса

Б – 3-и сутки после ИВВ конъюгата КТ

В – 7-е сутки динамического наблюдения

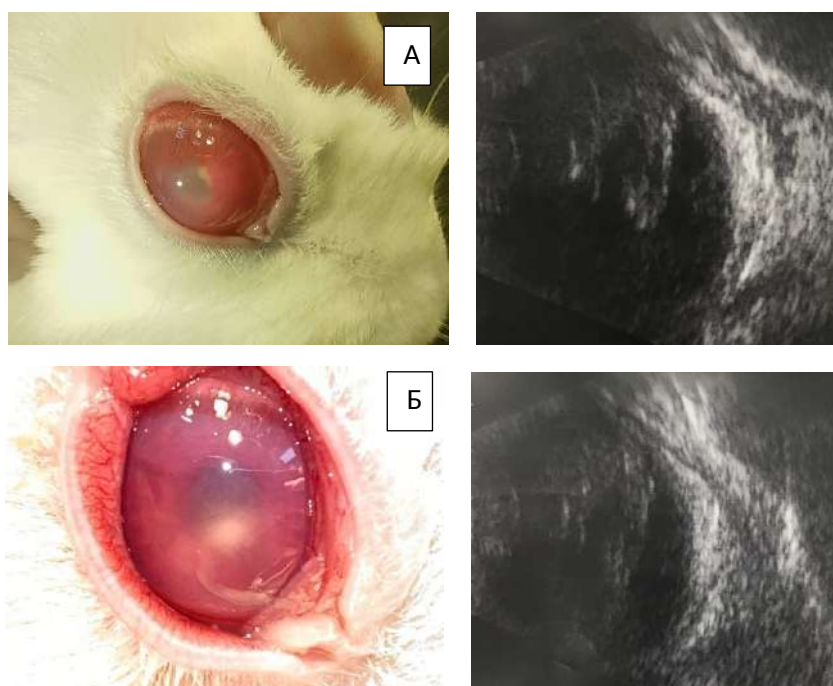
Рисунок 90 – Фото переднего отрезка (слева) и УЗИ (справа) лабораторного кролика 1-й группы

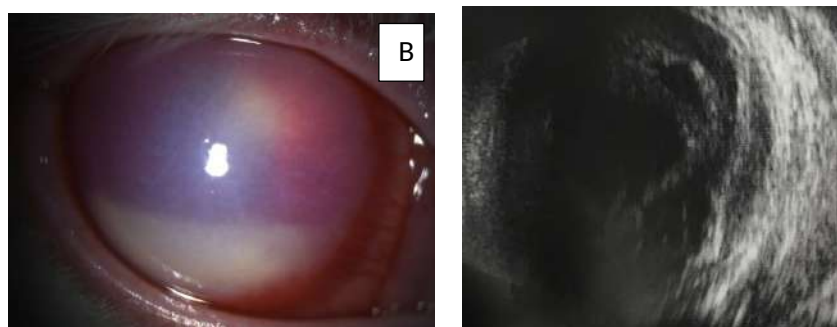
Результаты мониторинга динамики обратного развития симптомов у лабораторных животных 1-й группы представлены в Таблице 32, по шкале от 1 до 5, где 1 – низкая динамика, 5 – высокая.

Таблица 32 – Результаты мониторинга динамики обратного развития симптомов у кроликов 1-й группы

Кролик (n)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Признак										
Гипопион	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5
Феноме Тиндаля	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5
УЗИ	5	4	4	5	4	4	4	4	4	5
Радужка	5	4	4	5	5	5	5	5	4	5
Роговица	5	5	3	3	5	4	4	5	5	5

Кролики второй группы, получившие ИВВ Ванкомицина, демонстрировали ежедневный прогресс клинических проявлений, которые сопровождалось увеличением гипопиона, прогрессирующим отеком роговицы, тотальным вовлечением в воспалительный процесс передней камеры и витреальной полости (Рисунок 91). Через 1 неделю динамического наблюдения все животные были выведены из эксперимента.





А – 1-е сутки после манифестации патологического процесса

Б – 3-и сутки после ИВВ конъюгата КТ

В – 7-е сутки динамического наблюдения

Рисунок 91 – Пример. Фото переднего отрезка (слева) и УЗИ (справа) лабораторного кролика 2-й группы

Результаты мониторинга динамики обратного развития симптомов у лабораторных животных 2-й группы представлены в Таблице 33, по шкале от 1 до 5, где 1 – низкая динамика, 5 – высокая.

Таблица 33 – Результаты мониторинга динамики обратного развития симптомов у кроликов 2-й группы

Кролик (n)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Признак										
Гипопион	1	1	1	2	2	1	1	2	2	1
Феномен Тиндаля	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1
УЗИ	1	2	1	2	1	1	1	1	2	1
Радужка	3	1	3	2	3	2	1	1	2	3
Роговица	3	2	3	3	2	1	1	2	1	3

Сравнительная характеристика результатов обратного развития симптомов у исследуемых групп представлена на Рисунке 92.

Анализ полученных данных продемонстрировал увеличение эффективности лечения в 1-й группе (КТ/В) в сравнении со 2-й группой (В) на 120-130% ($p \leq 0,05$).

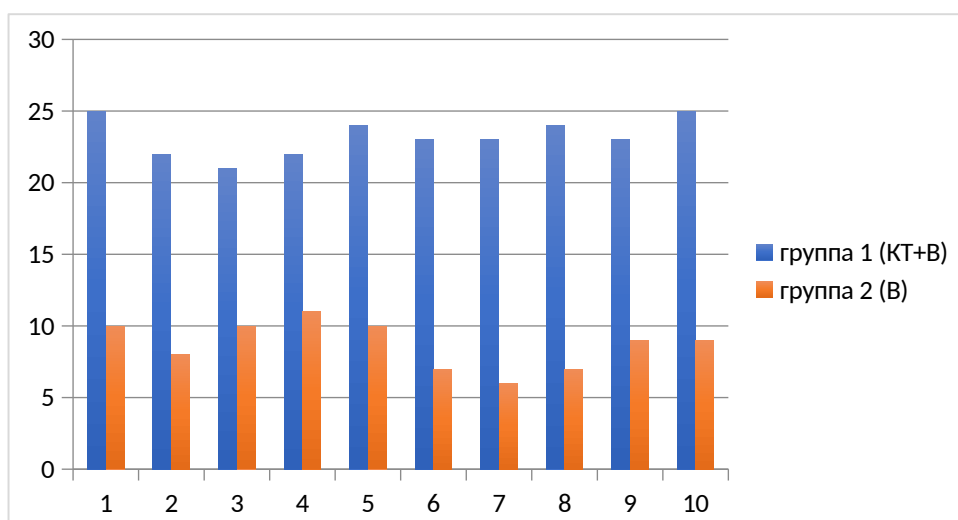


Рисунок 92 – Сравнительная характеристика результатов обратного развития симптомов, на основании суммарного анализа исследуемых признаков у лабораторных животных

В свою очередь математический анализ данных эффективности проводимого лечения на основании показателя динамики обратного развития симптомов (К, в баллах от 1 до 5) и показателя эффективности метода лечения (k) отображен в Таблице 34.

Таблица 34 – Сводные данные эффективности проводимого лечения на основании показателя динамики обратного развития симптомов (К) и показателя эффективности метода лечения (k)

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

Исходя из сводных данных Таблицы 34, показатели К и к демонстрируют улучшение анализируемых признаков в среднем в 2,6 раза, что доказывает высокую эффективность предложенной технологии лечения ($p \leq 0,05$).

Таким образом, в ходе изучения доклинической эффективности лечения антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза с помощью квантовых точек и конъюгатов на их основе в эксперименте *in vivo*, доказана эффективность лечения экспериментального кератита и эндофтальмита посредством применения конъюгатов, состоящих из исследуемых КТ: InP/ZnSe/ZnS 650, CdTe/Cd MPA 710, Ag(10%):InP/ZnS MPA в концентрациях от 0,1 до 0,001% в сочетании с АБ (Ванкомицин, Цефтазидим, Левофлоксацин, Тобрамицин) в сравнении со стандартной технологией лечения, продемонстрировав увеличение эффективности от 85 до 130% или в 2,6 раза ($p \leq 0,05$).

5.3. Анализ доклинической (анатомической и функциональной) безопасности применения квантовых точек и конъюгатов на их основе в разработанной технологии лечения антибиотикорезистентных инфекций глаза

Исследование КТ CdTe/Cd MPA 710 10% масс.

В эксперименте использовались нативные 10% масс. растворы КТ (Рисунок 93) в объемах 0,1 мл (раствор КТ1), которые были разведены с помощью аналитической мерной пипетки сбалансированным солевым раствором (ССР) до концентраций 0,1% масс. (100-кратное разведение, раствор КТ2) и 0,01% масс. (1000-кратное разведение, раствор КТ3). Стандартные разведения лиофилизатов Ванкомицина 1000 мг и Цефтазидима 1000 мг (АБ, используемые для интравитреального введения в лечении инфекционного эндофтальмита) доводили с помощью ССР до дозировок для

интраокулярного введения равных 1,0 мг/0,1 мл Ванкомицина (раствор В) и 2,25 мг/0,1 мл Цефтазидима (раствор Ц).

Далее производили смешивание КТЗ с В (раствор КТЗ/В) и Ц (раствор КТЗ/Ц) в равных объемных соотношениях.

На завершающем этапе выполняли центрифугирование полученных растворов на протяжении 3 мин в препаративной ультрацентрифуге при температуре 37°C. Непосредственно перед введением конъюгатов в витреальную полость лабораторных животных производили их взбалтывание.



Рисунок 93 – Нативный 10% раствор КТ CdTe/Cd МРА 710 (КТ1)

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 ($3,1 \pm 0,42$). Кролики были разделены на 6 групп (по 4 в каждой) и распределены следующим образом:

- в 1-й группе в витреальную полость вводили раствор КТ CdTe/Cd МРА 710 в дозировке 10% /0,1 мл (исходная концентрация) (КТ1);
- во 2-й – раствор КТ CdTe/Cd МРА 710 в дозировке 0,1% /0,1 мл (100-кратное разведение) (КТ2);
- в 3-й – раствор КТ CdTe/Cd МРА 710 в дозировке 0,01% /0,1 мл (1000-кратное разведение) (КТ3);

- в 4-й – раствор КТ CdTe/Cd МРА 710 в дозировке 0,01% /0,05 мл (1000-кратное разведение) в сочетании с 1 мг/0,05 мл Ванкомицина (КТЗ/В);
- в 5-й – раствор КТ CdTe/Cd МРА 710 в дозировке 0,01% /0,05 мл (1000-кратное разведение) в сочетании с 2,25 мг/0,05 мл Цефтазидима (КТЗ/Ц);
- в 6-й – в витреальную полость вводили сбалансированный солевой раствор в объеме 0,1 мл.

В правый глаз животных интравитреально вводили исследуемые растворы, левый глаз служил контролем (Рисунок 94).

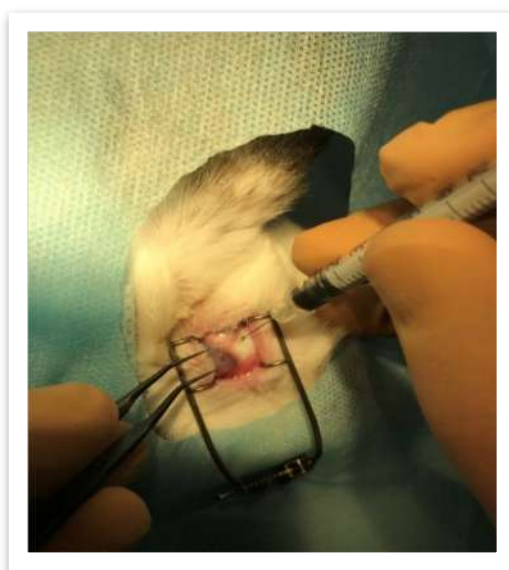


Рисунок 94 – Интравитреальное введение 10% раствора КТ CdTe/Cd МРА 710 (КТ1)

Всем животным на обоих глазах за 1 час до интравитреального введения растворов и через одну неделю после выполнялись: фоторегистрацию переднего отрезка (модульная фотощелевая лампа BQ 900, Haag-Streit, Швейцария); оптическую когерентную томографию (ОКТ) заднего и переднего отрезков (Optovue RTVue-100, США), ультразвуковую сонографию (УЗИ) (Tomey UD-8000, Япония) и электрофизиологическое исследование (ЭФИ).

Подопытных животных туго пеленали, ассистент фиксировал голову кролика у лобного упора прибора, после чего осуществляли фотофиксацию и проводили ОКТ в режиме radial lines для заднего отрезка.

Ультразвуковые исследования выполняли также после тугого пеленания: на контактную поверхность датчика наносили гель, исследование проводили путем наложения контактной части датчика на верхнюю и нижнюю поверхности волосистой части верхнего и нижнего век подопытного животного в шести меридианах.

Электроретинографию проводили на приборе Tomey ER-1000 (Япония). Применяли стандартную программу для бинокулярной ганцфельд-регистрации функциональной активности сетчатки ERG standart OU, используя контактные линзы-электроды с золотым напылением (ERG jet) в качестве активного компонента, накожные электроды по типу «кнопки» как отрицательный, и заземление (Рисунок 95). Запись ЭРГ-ответа осуществляли в условиях медикаментозного мидриаза, вызванного инстилляцией раствора «тропикамид + фенилэфрин» 8 мг+50 мг (Мидримакс, Сентисс Фарма, Индия), после предварительной анальгезии оксибупрокаином 4 мг (Инокаин, Сентисс Фарма, Индия). Для иммобилизации кроликов туго пеленали; накладывали электроды; темновая адаптация проходила в течение 30 минут, регистрировали палочковый и комбинированный ответ, световая адаптация занимала 15 минут, после чего фиксировали колбочковый отклик. Анализу подвергали а- и b-волны, стандартно оценивали амплитуду и латентность сигнала (Рисунок 96). Тестирование проводили двукратно – до введения КТ и биоконъюгатов на их основе и через 1 неделю после соответственно. Условная норма была получена после регистрации ЭРГ всем кроликам и статистической обработки полученных результатов (Таблица 35).



Рисунок 95 – Процесс подготовки кролика к проведению ЭФИ

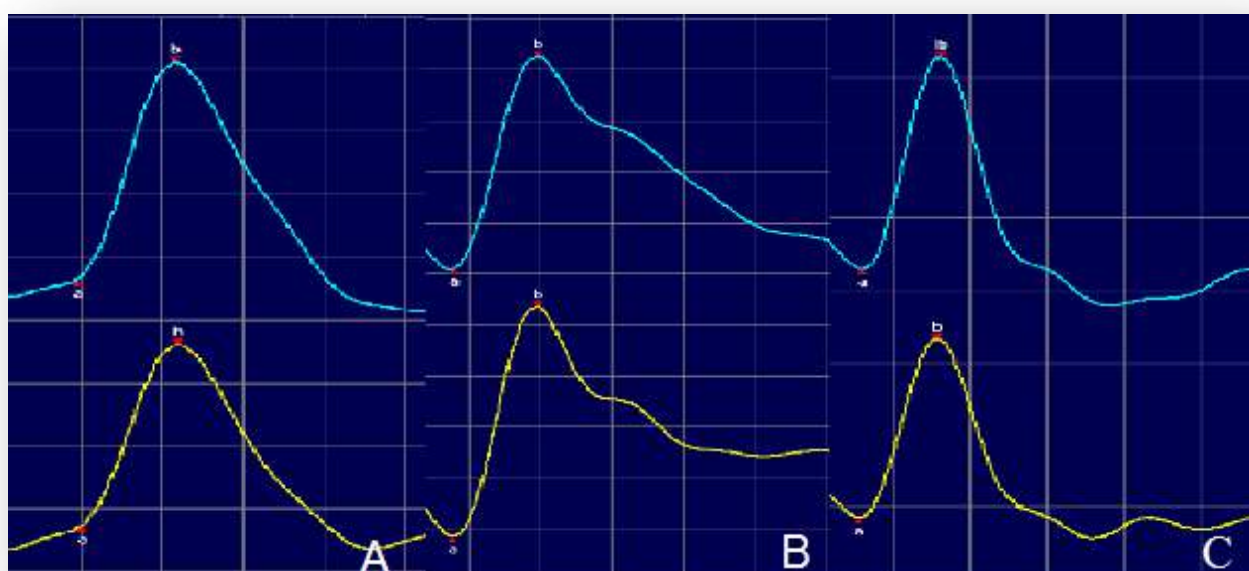


Рисунок 96 – Графическое изображение полученного сигнала:

А – палочковый ответ, четко выделяется структурная b-волна, без выраженной a-волны, Б – комбинированный ответ, С – колбочковый ответ

Таблица 35 – Условно нормальное распределение значений ЭРГ для исследуемой группы

Показатели	Палочковый ответ		Максимальный ответ		Колбочковый ответ	
	а-волна	б-волна	а-волна	б-волна	а-волна	б-волна
Амплитуда (мкВ)	10,0±3,4	78,5±8,2	45,6±5,1	203,3±9,7	10,6±1,5	68,0±8,3
Латентность (мс)	22,3±3,1	50,1±5,4	18,4±4,2	39,0±4,3	10,1±2,5	31,5±1,8

Исследование КТ InP/ZnSe/ZnS 650 10% масс и КТ Ag(10%):InP/ZnS МРА 10% масс. производили по той же методике.

В эксперименте участвовали 48 самцов (48 глаз) Новозеландских кроликов, весом от 3,0 до 3,2 кг (в среднем $3,1 \pm 0,32$ кг), в возрасте от 2,0 до 3,6 месяцев (в среднем $2,9 \pm 0,32$ месяцев).

Кролики были разделены на 6 групп, по 8 кроликов в каждой:

- в 1-й группе в витреальную полость вводили раствор КТ InP/ZnSe/ZnS 650 10% масс. (4 кролика) и КТ Ag(10%):InP/ZnS МРА 10% масс. (4 кролика) – исходная концентрация (10%) (КТ1а и КТ1б);

- во 2-й группе – КТ InP/ZnSe/ZnS 650 10% масс. (4 кролика) и КТ Ag(10%):InP/ZnS МРА 10% масс. (4 кролика) – 100-кратное разведение (0,1%) (КТ2а и КТ2б);

- в 3-й группе – КТ InP/ZnSe/ZnS 650 10% масс. (4 кролика) и КТ Ag(10%):InP/ZnS МРА 10% масс. (4 кролика) – 1000-кратное разведение (0,01%) (КТ3а и КТ3б);

- в 4-й группе – КТ InP/ZnSe/ZnS 650 10% масс (4 кролика) и КТ типа Ag(10%):InP/ZnS МРА 10% масс. в 1000-кратном разведении в сочетании с раствором Ванкомицина (КТ/Ва и КТ/Вб) (4 кролика);

- в 5-й группе – КТ InP/ZnSe/ZnS 650 10% масс (4 кролика) и КТ типа Ag(10%):InP/ZnS МРА 10% масс. в 1000-кратном разведении в сочетании с раствором Цефтазидима (КТ/Ца и КТ/Цб) (4 кролика);

- в 6-й группе в витреальную полость вводили сбалансированный солевой раствор (8 кроликов).

Результаты, полученные при исследовании КТ CdTe/Cd МРА 710 10 % масс.

Кролики первой группы (n=4), получившие интравитреальную инъекцию нативного раствора КТ CdTe/Cd МРА 710 (КТ1) в дозировке 10% /0,1 мл через 1 неделю динамического наблюдения продемонстрировали отсутствие диффузии раствора по витреальной полости, которое отчетливо видно на Рисунке 97, в виде темной однородной гиперрефлективной взвеси только в передних отделах стекловидно тела.

При фоторегистрации переднего отрезка во всех случаях визуализировался отек роговицы, выраженное полнокровие сосудов радужной оболочки, снижение качества рефлекса глазного дна (за счет гиперрефлективной взвеси в витреальной полости (Рисунки 98, 99).

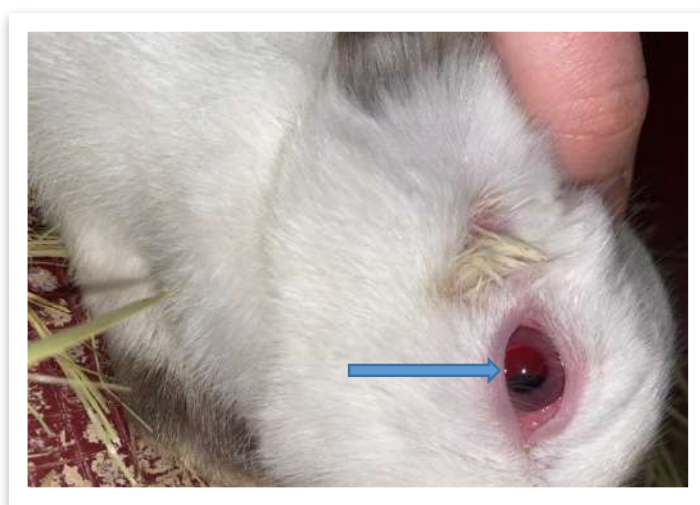


Рисунок 97 – Пример фотографии внешнего вида кролика, через 1 неделю после введения 10% раствора КТ CdTe/Cd МРА 710 (КТ1).

Гиперрефлективная взвесь обозначена стрелкой

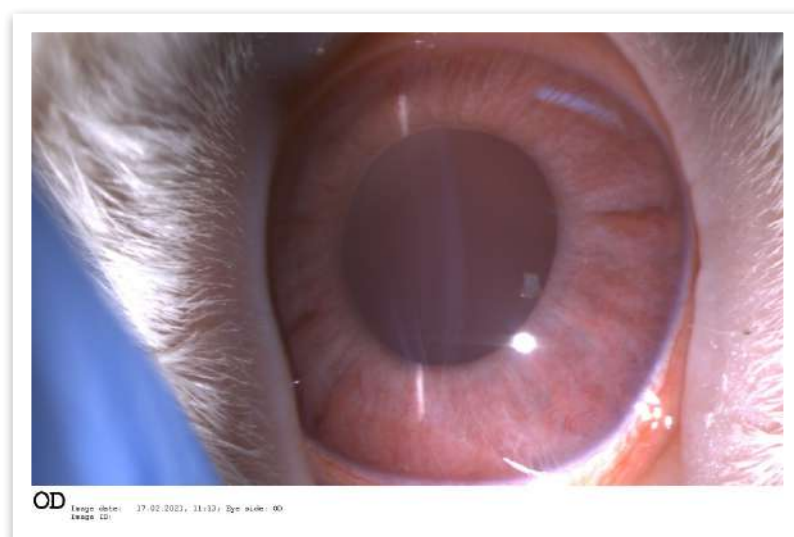


Рисунок 98 – Пример фотографии переднего отрезка глаза кролика, через 1 неделю после введения нативного 10% раствора КТ CdTe/Cd МРА 710 (КТ1)

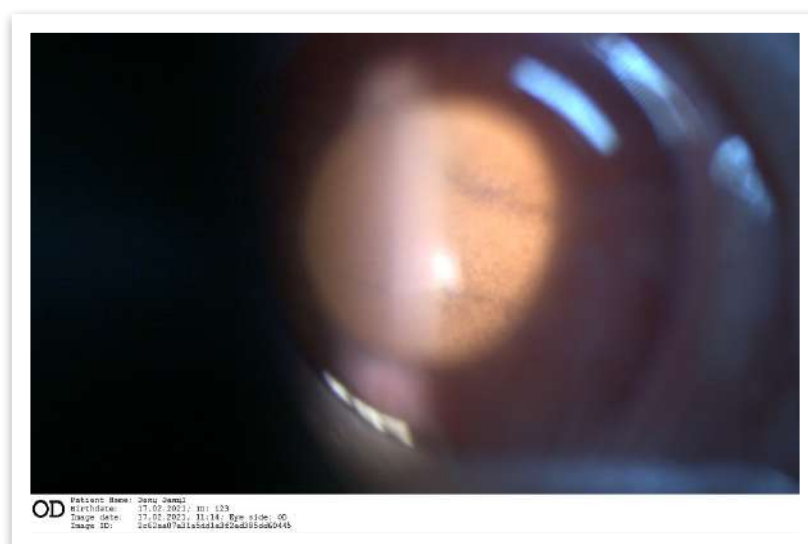


Рисунок 99 – Пример фотографии взвеси в витреальной полости при смещении фокуса фотоцелевой лампы через 1 неделю после введения 10% раствора КТ CdTe/Cd МРА 710 (КТ1)

По данным УЗИ у всех животных была выявлена интенсивная гиперрефлективная взвесь в витреальной полости (Рисунок 100).



Рисунок 100 – Пример ультразвукографии правого глаза кролика через 1 неделю после введения 10% раствора КТ CdTe/Cd МРА 710 (КТ1)

По данным ОКТ заднего отрезка была выявлена интенсивная гиперрефлективная взвесь в преретиальном пространстве с нарушением структурной дифференцировки клеток сетчатки (Рисунок 101).

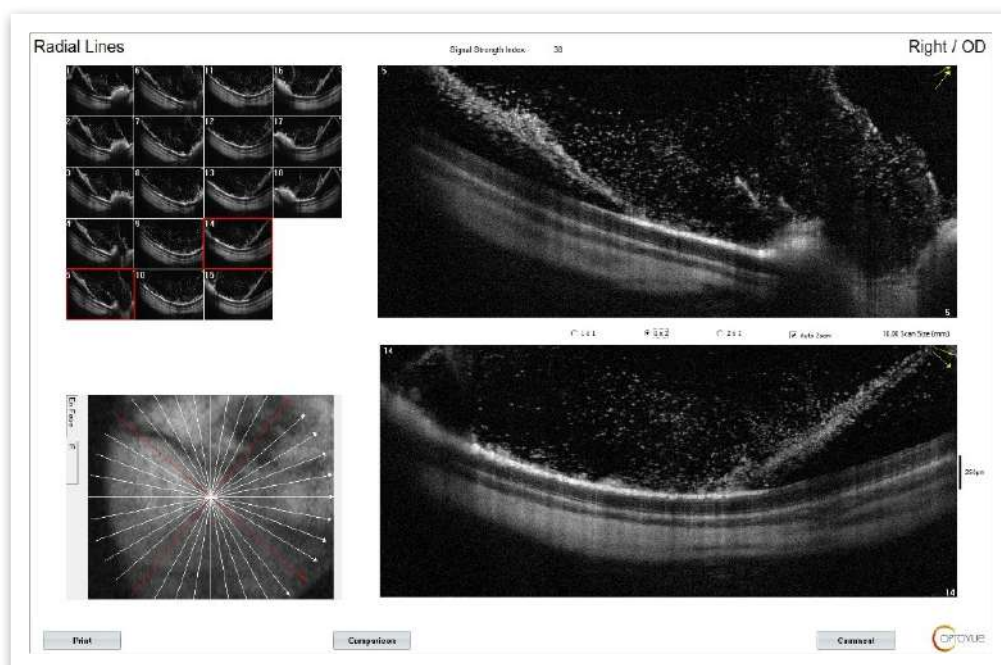


Рисунок 101 – Пример ОКТ кролика, через 1 неделю после введения 10% раствора КТ CdTe/Cd МРА 710 (КТ1)

По данным ЭФИ структурный ответ на световой стимул отсутствовал на всех этапах регистрации, что связано с нарушением прозрачности оптических сред, и вероятно, с вовлечением в процесс сетчатки (Таблицы 36, 37).

Таблица 36 – Суммарные показатели латентности волн ЭРГ (мс)

Квантовые точки	Палочковый ответ		Максимальный ответ		Колбочковый ответ	
	а-волна	б-волна	а-волна	б-волна	а-волна	б-волна
КТ1 (10%)	41,5±14,5	72,4±6,5	32,3±8,4	61,6±10,4	21,1±10,2	67,5±10,5
КТ2 (0,1%)	36,3±4,3	46,6±5,3	15,2±2,4	41,0±4,2	12,6±3,4	34,2±3,6
КТ3 (0,01%)	20,1±7,5	52,3±3,4	15,7±2,8	42,6±3,1	10,7±6,4	32,0±3,8
КТ/В (0,01% + Ванкомицин)	25,2±5,2	53,7±2,6	19,9±5,2	37,6±2,4	13,8±3,1	35,9±4,6
КТ/Ц (0,01% + Цефтазидим)	20,5±7,6	59,1±7,8	14,9±2,3	38,1±5,9	18,5±6,3	41,2±5,3
Физраствор	21,4±4,4	49,7±6,4	21,2±2,1	39,8±4,6	15,7±4,2	29,8±3,1

Таблица 37 – Суммарные показатели амплитуды волн ЭРГ (мкВ)

Квантовые точки	Палочковый ответ		Максимальный ответ		Колбочковый ответ	
	а-волна	б-волна	а-волна	б-волна	а-волна	б-волна
КТ (10%)	5,4±4,2	2,1±18,2	2,1±5,1	4,1±7,1	5,8±2,1	6,8±4,2
КТ2 (0,1%)	1,9±2,3	11,1±5,1	14,3±7,1	102,1±10,2	5,1±3,1	28,5±12,2
КТ3 (0,01%)	14,3±6,4	61,5±9,2	43,1±7,5	213,3±11,2	11,6±1,1	67,0±5,6
КТ/В (0,01% + Ванкомицин)	9,3±5,1	71,1±7,4	44,1±6,2	212,3±12,1	12,9±7,3	61,7±4,1
КТ/Ц (0,01% + Цефтазидим)	13,1±6,8	56,5±9,1	22,6±6,2	206,2±10,1	5,1±3,8	15,7±7,6
Физраствор	12,4±6,1	74,5±7,5	43,4±2,5	202,3±8,5	14,6±6,1	64,0±5,1

Кролики второй группы (n=4), получившие интравитреальную инъекцию раствора КТ CdTe/Cd МРА 710 (КТ2) в дозировке 0,1% /0,1 мл (100-кратное разведение) через 1 неделю динамического наблюдения во всех случаях демонстрировали практически полную интактность со стороны глазных структур, за исключением слабовыраженного полнокровия сосудов радужной оболочки (Рисунок 102).

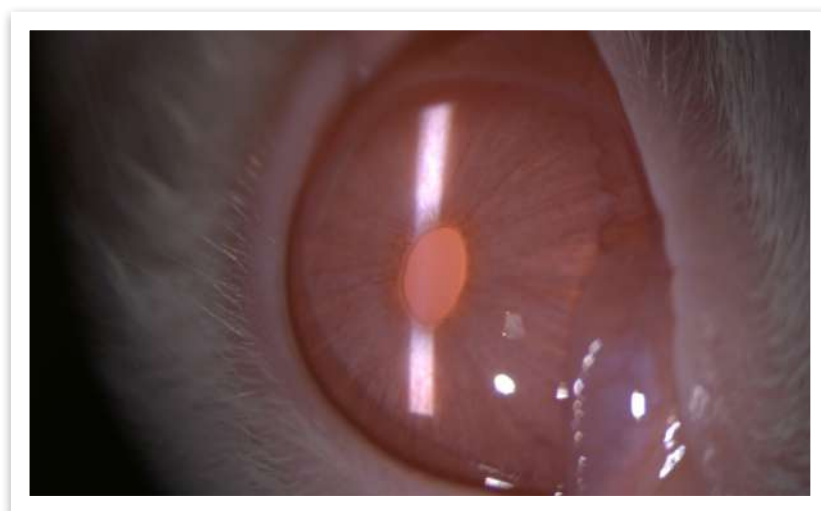
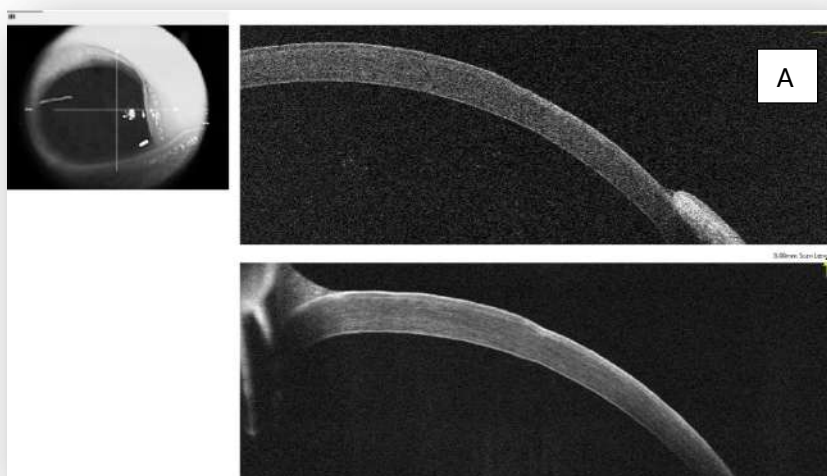
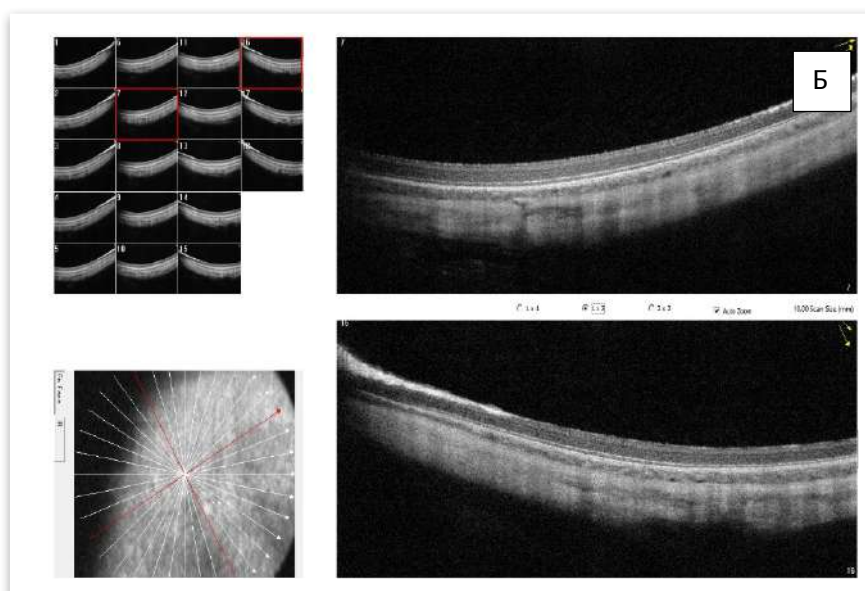


Рисунок 102 – Пример фотографии переднего отрезка глаза кролика через 1 неделю после введения 0,1% раствора КТ CdTe/Cd МРА 710 (КТ2)

В таких структурах, как роговица, сетчатка и стекловидное тело, каких-либо патологических реакций и изменений выявлено не было (Рисунки 103, 104).

Электроретинограмма демонстрировала снижение амплитуды а- и б-волн, с увеличением латентности а-волны палочкового ответа. Также снижение амплитуды обоих компонентов зарегистрировано во время максимального и колбочкового отклика (см. Таблицы 36, 37).





А – ОКТ переднего отрезка

Б – ОКТ заднего отрезка

Рисунок 103 – Пример ОКТ глаза кролика через 1 неделю после введения 0,1% раствора КТ CdTe/Cd МРА 710 (КТ2)

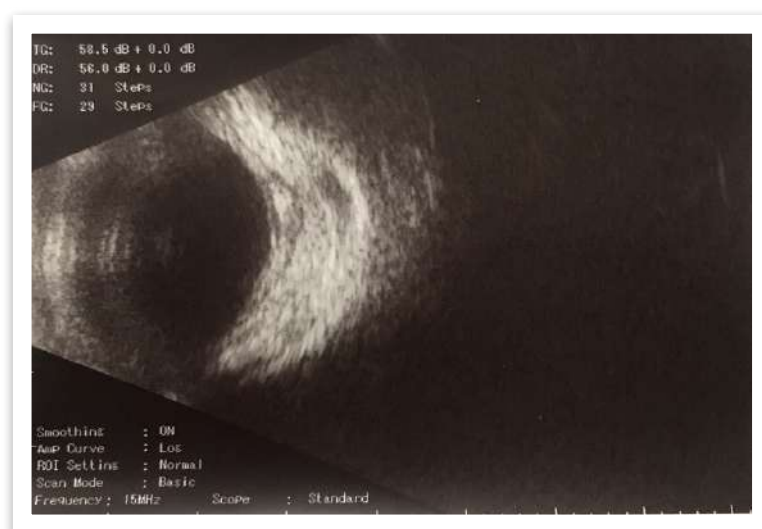


Рисунок 104 – Пример ультрасонографии глаза кролика через 1 неделю после введения 0,1% раствора КТ CdTe/Cd МРА 710 (КТ2)

Кроликам третьей группы вводили растворы КТ CdTe/Cd МРА 710 (КТ3) в дозировке 0,01% /0,1 мл (1000-кратное разведение). У данной группы лабораторных животных не было выявлено каких-либо реакций со стороны

глазных структур за весь период динамического наблюдения (Рисунки 105, 106).

Показатели ЭРГ третьей группы соответствовали нормальным, регистрировался структурный ответ на световые импульсы (см. Таблицы 36, 37).

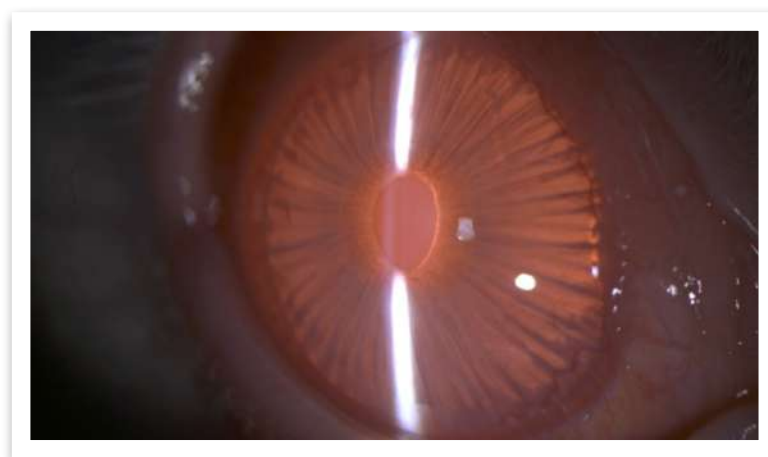
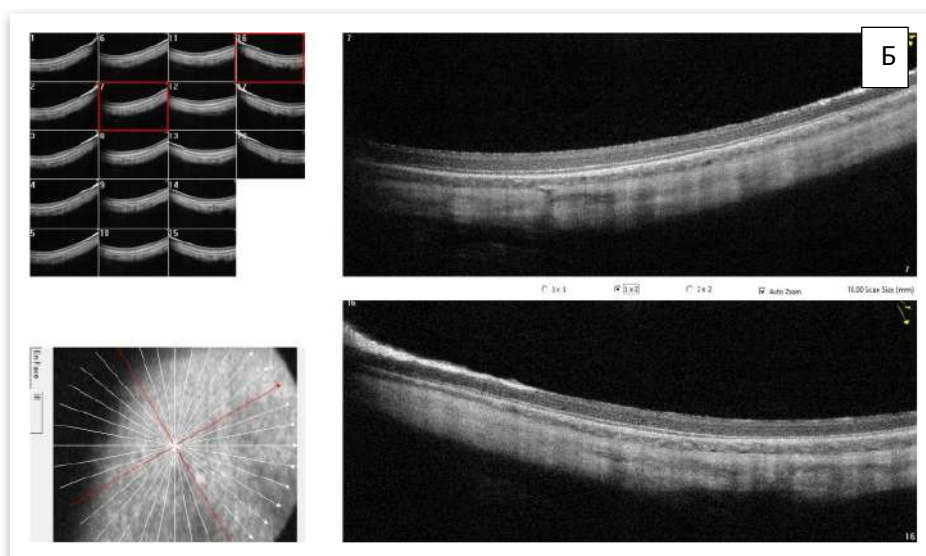


Рисунок 105 – Пример фотографии переднего отрезка глаза кролика через 1 неделю после введения 0,01% раствора КТ CdTe/Cd МРА 710 (КТЗ)





А – ОКТ переднего отрезка

Б – ОКТ заднего отрезка

Рисунок 106 – Пример ОКТ глаза кролика через 1 неделю после введения 0,01% раствора КТ CdTe/Cd МРА 710 (КТЗ)

На основании полной ареактивности со стороны глазных структур данная концентрация КТ, в виде 0,01% растворов, была выбрана в качестве исходной для создания конъюгатов с исследуемыми АБ (4-я и 5-я группы лабораторных животных).

Кроликам четвертой группы вводили растворы КТ CdTe/Cd МРА 710 в дозировке 0,01% /0,05 мл (1000-кратное разведение) в сочетании с 1 мг/0,05 мл Ванкомицина (КТЗ/В). На седьмой день динамического наблюдения во всех случаях выявляли локальную гиперрефлективную взвесь в витреальной полости (Рисунок 107), а также незначительную гиперрефлективную взвесь преретинально по данным ОКТ заднего отрезка (Рисунок 108). Остальные глазные структуры демонстрировали полную ареактивность.

По данным ЭФИ не было выявлено снижения активности структур сетчатки (см. Таблицы 36, 37).



Рисунок 107 – Пример ультразвукографии глаза кролика через 1 неделю после введения 0,01% раствора CdTe/Cd МРА 710 в сочетании с 1 мг/0,05 мл Ванкомицина (КТЗ/В)

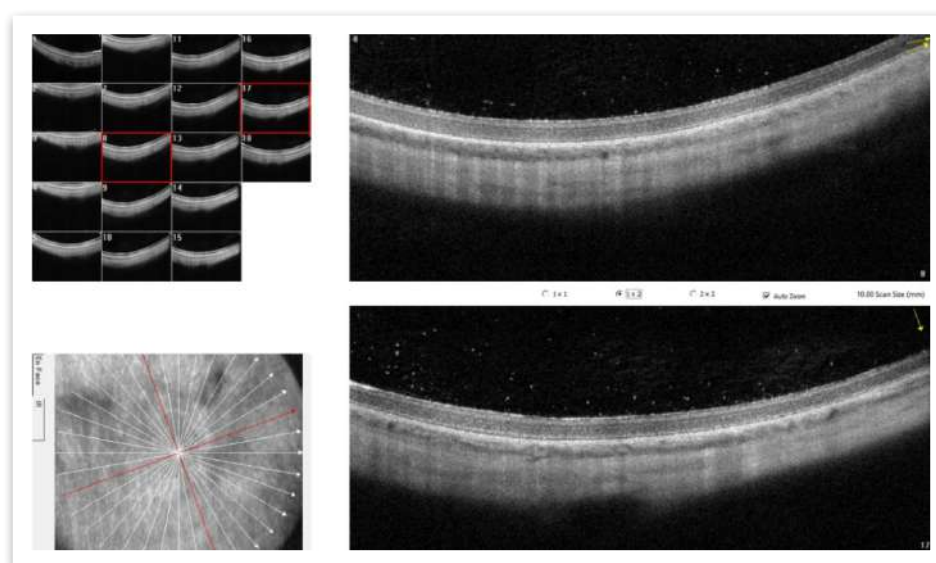


Рисунок 108 – Пример ОКТ заднего отрезка глаза кролика через 1 неделю после введения 0,01% раствора КТ CdTe/Cd МРА 710 в сочетании с 1 мг/0,05 мл Ванкомицина (КТЗ/В)

Четырем кроликам пятой группы вводили растворы КТ CdTe/Cd МРА 710 в дозировке 0,01% /0,05 мл (1000 кратное разведение) в сочетании с 2,25 мг/0,05 мл Цефтазидима (КТЗ/Ц). В данной группе было выявлено значительно большее количество гиперрефлективной взвеси в витреальной

полости (Рисунок 109) и преретинально (Рисунок 110), тем не менее, остальные глазные структуры оставались полностью интактными за весь период наблюдения.



Рисунок 109 – Пример ультразвукографии глаза кролика через 1 неделю после введения 0,1% раствора КТ CdTe/Cd МРА 710 в сочетании с 2,25 мг/0,05 мл Цефтазидима (КТЗ/Ц)

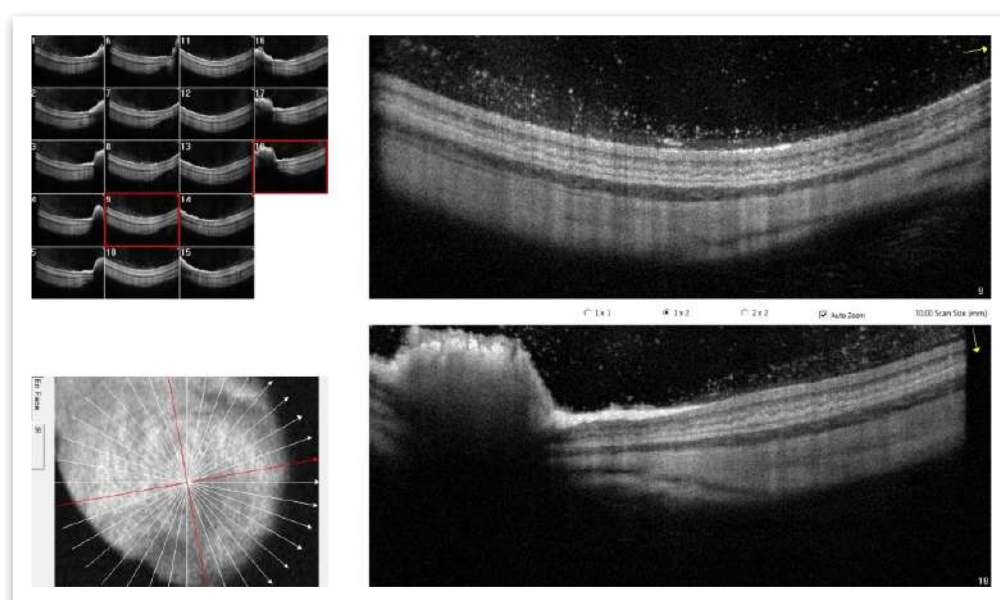


Рисунок 110 – Пример ОКТ заднего отрезка глаза кролика через 1 неделю после введения 0,1% раствора КТ CdTe/Cd МРА 710 в сочетании с 2,25 мг/0,05 мл Цефтазидима (КТЗ/Ц)

По данным ЭФИ было выявлено незначительное снижение амплитуды палочкового и колбочкового ответов, с увеличением латентности b-волны колбочкового ответа (см. Таблицы 36, 37).

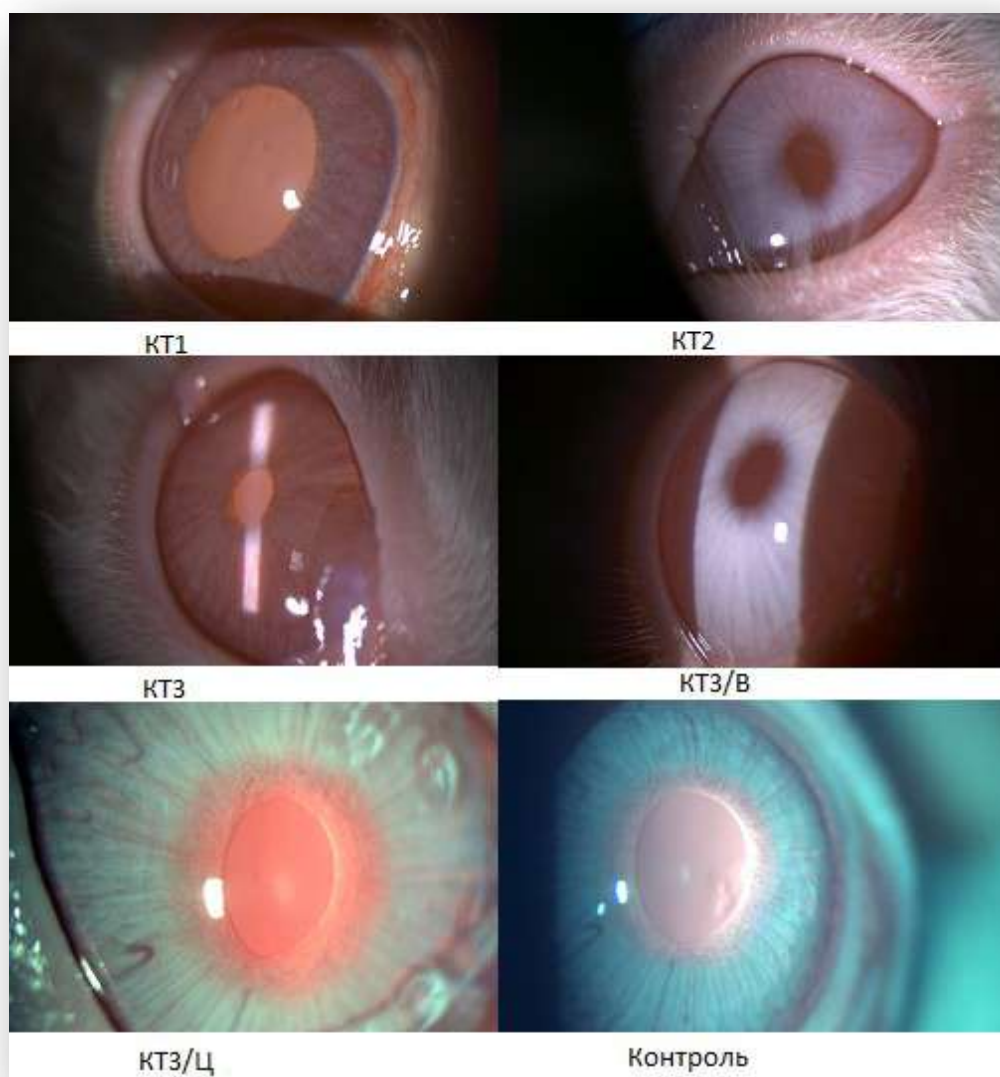
Кролики шестой группы, получавшие в качестве инъекции сбалансированный солевой раствор в объеме 0,1 мл, за весь период наблюдения не демонстрировали каких-либо патологических проявлений со стороны структур глаза. По данным ЭФИ отклонений выявлено не было (см. Таблицы 36, 37).

Результаты исследования КТ типа InP/ZnSe/ZnS 650 10% масс. (а) и КТ Ag(10%):InP/ZnS МРА 10% масс.(б)

Фоторегистрация переднего отрезка

Изменения в виде выраженного полнокровия сосудов радужной оболочки были выявлены в случае инъекции нативной 10% дозы КТ InP/ZnSe/ZnS 650 (КТ1а). В случаях использования КТ типа Ag(10%):InP/ZnS МРА (КТ1б) 10% масс. изменений со стороны структур переднего и заднего отрезков выявлено не было ни в одном случае.

На Рисунке 111 изображены КТ1 – InP/ZnSe/ZnS 650 в виде 10% раствора, КТ2 – 0,1% раствор, КТ3 – 0,01% раствор, КТ3/В – конъюгат с Ванкомицином, КТ3/Ц – конъюгат с Цефтазидимом; контроль – сбалансированный солевой раствор.



Рисуно

к 111 – Примеры фотографий переднего отрезка подопытных животных
после введения растворов различных концентраций КТ типа

InP/ZnSe/ZnS 650

ОКТ

При исследовании заднего отрезка во всех случаях была сохранена нормальная анатомия сенсорной сетчатки, однако полное отсутствие локальной гиперрефлективной взвести в преретинальной области наблюдалось лишь с 1000-кратного (КТ3) разведения квантовых точек (Рисунок 112).

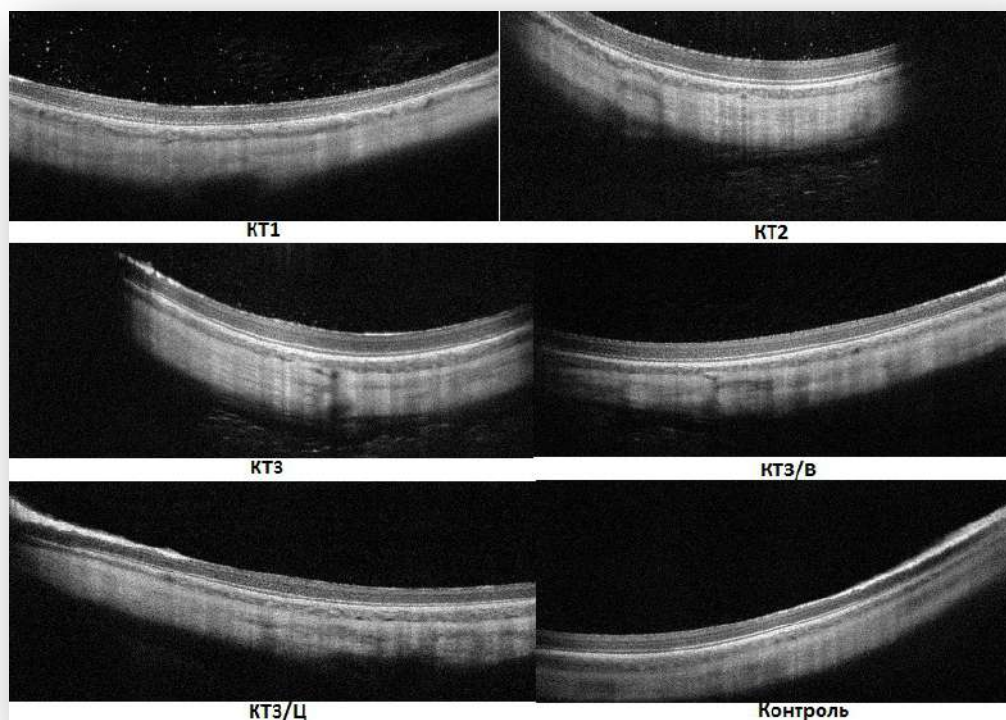


Рисунок 112 – Пример ОКТз подопытных животных при использовании КТ Ag(10%):InP/ZnS МРА в различных концентрациях, где КТ1 – 10% раствор, КТ2 – 0,1%, КТ3 – 0,01%, КТ3/В и КТ/Ц – конъюгаты с соответствующими АБ

УЗИ

На ультрасонографических сканах не было выявлено каких-либо отклонений от контрольной группы, за исключением локальной подвижной гиперрефлективной взвеси в нижних отделах витреальной полости у подопытных животных первой группы (КТ1а) (Рисунок 113).

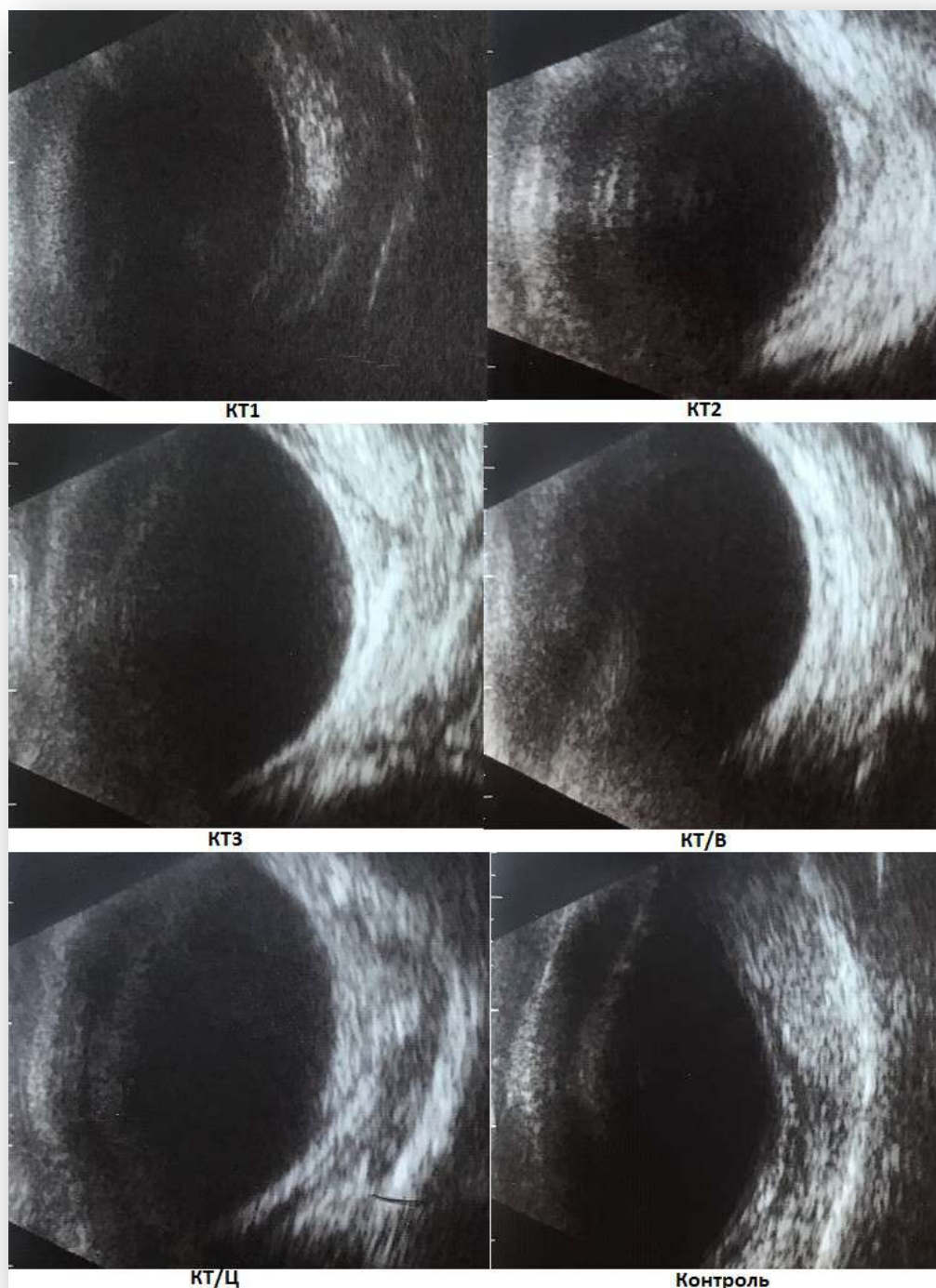


Рисунок 113 – Пример УЗИ заднего отрезка подопытных животных при использовании КТ InP/ZnSe/ZnS 650 в различных концентрациях, где КТ1 – 10% раствор, КТ2 – 0,1%, КТ3 – 0,01%, КТ3/В и КТ/Ц – конъюгаты с соответствующими АБ

ЭФИ

По данным электрофизиологического исследования ни у одного животного не было обнаружено выраженного снижения основных показателей электрофизиологической активности сетчатки (Рисунок 114, Таблицы 38, 39).

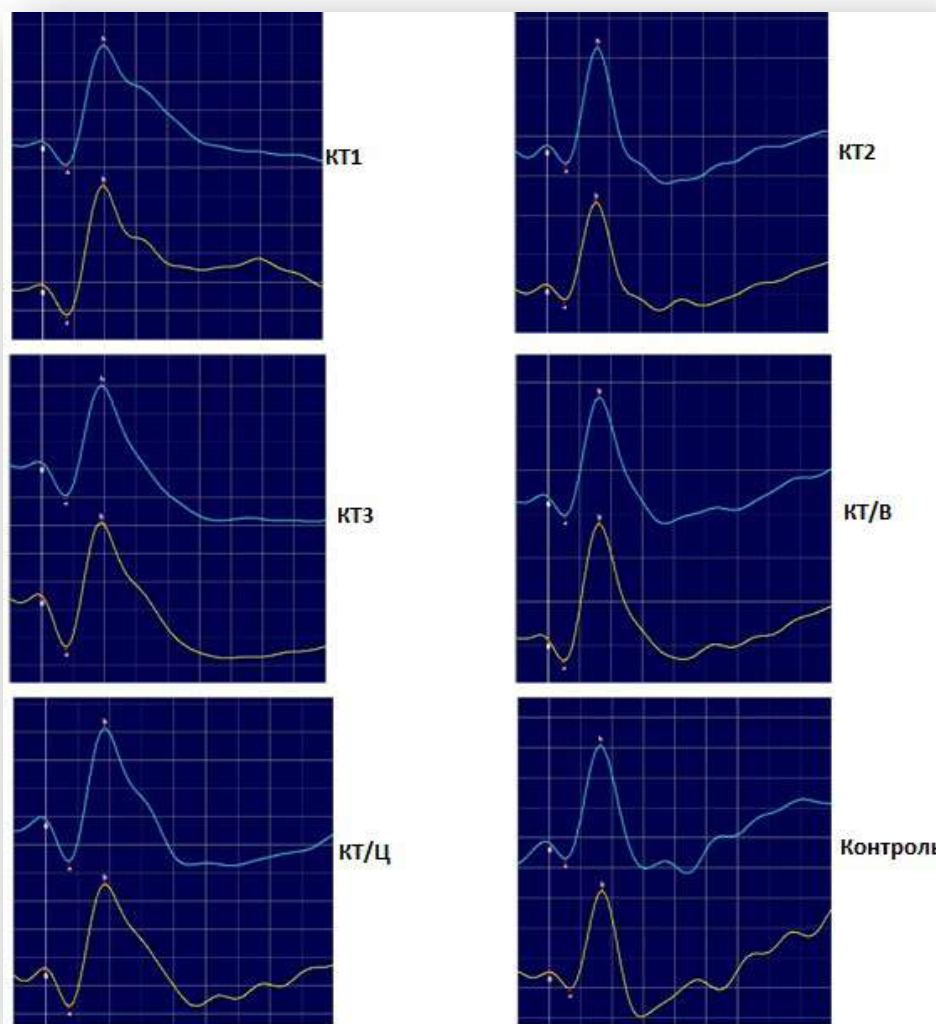


Рисунок 114 – Пример ЭФИ заднего отрезка подопытных животных при использовании КТ InP/ZnSe/ZnS 650 в различных концентрациях, где КТ1 – 10% раствор, КТ2 – 0,1%, КТ3 – 0,01%, КТ3/В и КТ/Ц – конъюгаты с соответствующими АБ

Таблица 38 – Суммарные показатели латентности волн ЭРГ (мс) КТ типа InP/ZnSe/ZnS 650 10 % масс. (а) и КТ Ag(10%):InP/ZnS МРА 10% масс. (б)

Квантовые точки	Палочковый ответ		Максимальный ответ		Колбочковый ответ	
	а-волна	б-волна	а-волна	б-волна	а-волна	б-волна
КТ1а 10%	21,2±5,3	51,0±3,4	15,8±2,1	41,0±2,1	11,5±6,4	32,1±3,7
КТ1б 10%	22,0±3,3	52,0±2,3	14,5±2,1	43,0±2,1	12,5±6,1	33,0±3,8
КТ2а 0,1%	20,1±7,3	52,5±5,3	14,6±2,7	43,0±2,5	11,7±2,5	32,0±1,6
КТ2б 0,1%	21,0±2,3	51,0±6,3	14,5±5,2	44,0±2,9	12,5±8,3	33,0±3,6
КТ3а 0,01%	20,8±6,3	52,3±5,3	14,5±2,4	41,0±2,1	10,8±6,2	33,6±3,1
КТ3б 0,01%	20,6±2,1	51,3±1,3	15,2±2,4	41,3±4,1	10,1±2,3	32,5±3,6
КТ/Ва	20,4±1,3	50,7±3,2	16,1±2,2	42,1±3,5	11,5±1,3	32,5±4,6
КТ/Вб	21,4±4,3	51,1±3,1	14,2±2,7	42,0±5,1	12,5±6,4	33,4±3,1
КТ/Ца	22,6±7,1	50,3±2,3	15,3±3,1	43,2±2,1	11,1±2,3	31,1±3,5
КТ/Цб	22,4±5,3	52,1±1,1	15,5±1,1	43,1±3,1	10,2±6,1	32,1±6,6
Физраствор	21,0±1,3	52,3±3,1	14,6±5,1	42,1±3,2	11,3±6,9	31,0±2,6

Таблица 39 – Суммарные показатели амплитуды волн ЭРГ (мкВ) КТ типа InP/ZnSe/ZnS 650 10 % масс. (а) и КТ Ag(10%):InP/ZnS МРА 10% масс. (б)

Квантовые точки	Палочковый ответ		Максимальный ответ		Колбочковый ответ	
	а-волна	б-волна	а-волна	б-волна	а-волна	б-волна
КТ1а 10%	13,0±2,1	68,4±5,2	43,9±7,1	210,5±6,3	11,1±1,7	68,5±1,3
КТ1б 10%	12,0±1,2	70,5±6,5	44,1±1,6	212,1±5,7	10,6±1,7	68,0±5,7
КТ2а 0,1%	12,0±2,4	70,5±2,5	43,6±7,1	213,3±5,7	9,6±1,5	67,2±5,7
КТ2б 0,1%	12,0±5,3	71,6±6,2	42,4±5,6	211,5±2,3	11,6±1,3	67,1±2,7
КТ3а 0,01%	13,0±5,4	68,2±6,5	44,1±5,6	212,3±11,7	12,4±1,3	69,1±5,3
КТ3б 0,01%	13,0±4,4	69,5±1,2	44,2±7,5	214,3±14,2	10,6±1,5	69,0±4,7
КТ/Ва	14,0±4,5	67,3±6,7	42,6±4,6	211,3±11,7	10,4±1,59	69,6±5,2
КТ/Вб	14,0±3,4	72,1±2,2	44,5±7,5	212,1±10,4	11,6±1,5	67,6±4,7
КТ/Ца	13,0±1,6	71,6±6,1	44,4±1,6	213,3±8,7	10,5±1,5	67,0±5,1
КТ/Цб	14,0±2,4	71,8±6,8	43,2±1,5	214,6±11,1	12,1±1,9	66,9±5,2
Физраствор	13,0±1,9	70,6±1,2	44,4±6,6	211,3±12,6	11,1±1,1	67,3±5,9

Таким образом, в ходе проведенных клинических и инструментальных методов исследования в эксперименте *in vivo* по изучению анатомической и функциональной безопасности применения квантовых точек и конъюгатов на их основе в лечении антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза установлено, что 10% раствор КТ CdTe/Cd МРА 710 обладает признаками токсичности по данным проведенных клинических и функциональных методов исследования. Концентрация раствора от 0,01% и ниже является безопасной. В чистом виде КТ типов InP/ZnSe/ZnS 650 и Ag(10%):InP/ZnS МРА и в составе конъюгатов безопасны во всех исследуемых концентрациях.

5.4. Анализ клеточной и тканевой безопасности применения квантовых точек и конъюгатов на их основе в разработанной технологии лечения антибиотикорезистентных инфекций глаза

Экспериментальная часть по исследованию тканевой безопасности

В эксперименте принимали участие Новозеландские кролики ($n=27$), мужского пола в возрасте от 3,0 до 3,5 месяцев ($3,2 \pm 1,5$), весом от 3,5 до 4,0 кг ($3,7 \pm 0,34$). Животные содержались в условиях вивария в Научно-исследовательском институте Фтизиопульмонологии, г. Екатеринбург.

В качестве индуктора воспалительной реакции всем лабораторным животным ($n=27$) в правый глаз была произведена интравитреальная инъекция мультирезистентной синегнойной палочки в объеме 0,05 мл мутностью 0,5 по стандарту МакФарланда.

После индукции патологического процесса, верификации возбудителя и постановки диагноза – острый бактериальный эндофтальмит, животным проводили лечебные интравитреальные инъекции лекарственных форм в соответствии с распределением по следующим группам (3 кролика в каждой):

- 1-я группа ($n=3$) – ИВВ раствора Ag(10%):InP/ZnS МРА 0,1 мл в стандартной 10% концентрации (основанием к выбору данного типа КТ явилось отсутствие признаков токсического повреждения интраокулярных

структур, согласно данным предыдущего этапа диссертационного исследования);

- 2-я группа (n=3) – ИВВ раствора Ag(10%):InP/ZnS МРА в 100-кратном разведении (0,1%);

- 3-я группа (n=3) – ИВВ раствора Ag(10%):InP/ZnS МРА в 1000-кратном разведении (0,01%);

- 4-я группа (n=3) – ИВВ раствора Ag(10%):InP/ZnS МРА 0,05 мл в стандартной 10% концентрации, в сочетании с 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) – ИВВ раствора Ag(10%):InP/ZnS МРА 0,05 мл в 100-кратном разведении (0,1%), в сочетании с 2,25 мг/0,05 мл Цефтазидима – Конъюгат № 2;

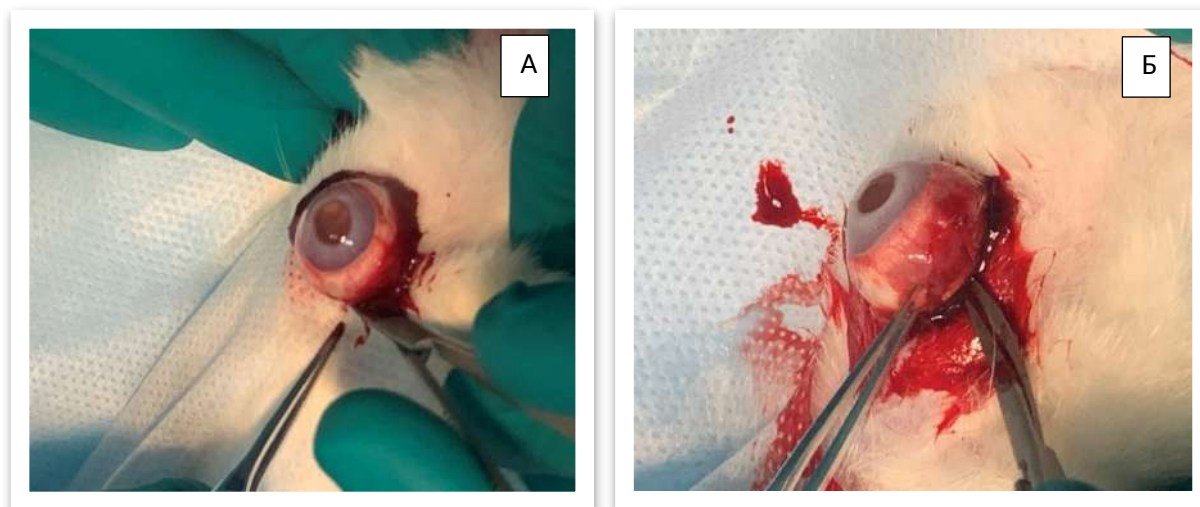
- 6-я группа (n=3) – ИВВ раствора Ag(10%):InP/ZnS МРА 0,05 мл в 1000 кратном разведении (0,01%), в сочетании с 2,25 мг/0,05 мл Цефтазидима – Конъюгат № 3;

- 7, 8, 9-я группы (n=9) – интравитреальная инъекция 2,25 мг/0,1 мл Цефтазидима, в качестве контроля.

Через 1 неделю динамического наблюдения всем животным производили энуклеацию правых глазных яблок, в условиях стерильной операционной под наркозом (Рисунок 115), который заключался в предварительном (за 10 минут до вмешательства) внутримышечном введении 0,4 мг ксилазина гидрохлорида (Ксилазин), в сочетании 0,04 мг тилеамина гидрохлорида (Телазол). Далее в одном шприце вводили Анальгин 0,5 мл (250 мг) и Димедрол 0,3 мл (3 мг) для последующего послеоперационного обезболивания лабораторных животных.

Энуклеацию осуществляли посредством вскрытия конъюнктивы, пересечения мышц; под визуальным контролем производили пересечение диска зрительного нерва совместно с сосудистым пучком; с гемостатической целью использовали давящую ватную турунду, пропитанную раствором

адреналина 0,1%/новокаина 0,5%; на завершающем этапе из конъюнктивы формировали ложе, посредством наложения обвивного шва Викрил 8-0 и контроля гемостаза.



А – отсечение мышц

Б – пересечение зрительного нерва

Рисунок 115 – Этапы энуклеации глазных яблок лабораторных животных

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, г. Екатеринбург (Рисунок 116).



Рисунок 116 – Энуклеированное глазное яблоко лабораторного животного
в растворе формалина

Из материала были вырезаны микропрепараты толщиной 2-3 мм, которые проводились по спиртам повышающейся концентрации и были залиты в парафин. Изготовленные срезы толщиной 3-4 мкм окрашены гематоксилином и эозином.

Микроскопирование осуществляли при помощи с микроскопа Olympus CX-41 (Германия). При микрофотографировании использовали камеру Olympus Soft Imaging Solution GMBH, Model LC20 (Германия), а также компьютерная программа LC-Micro (5.2).

На основании полученных результатов в ходе проведенного гистоморфологического исследования энуклеированные глаза животных были условно разделены на три группы:

- группу 1 составили микропрепараты кроликов 7, 8 и 9-й (n=9), получавших интравитреальную инъекцию 2,25 мг/0,1 мл Цефтазидима в качестве контроля. Группа характеризовалась наиболее выраженными (умеренно-выраженными) воспалительными изменениями структур глаза.

Роговица: в области угла передней камеры, в месте перехода роговицы в склеру в волокнистом слое определялись полнокровные сосуды с признаками капилляростаза (Рисунок 117).

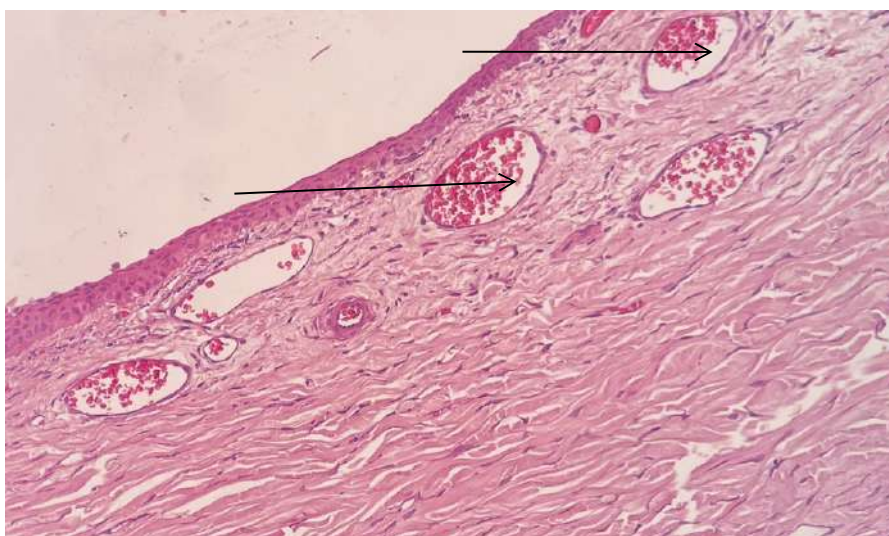


Рисунок 117 – Область угла передней камеры глаза лабораторного животного группы 1, стрелками обозначены расширенные полнокровные капилляры (окраска гематоксилин-эозином, увеличение x400)

Центральные отделы роговицы: эпителий неизменен, в строме роговицы наблюдались единичные расширенные сосуды вблизи корнеосклерального лимба. Эндотелий и Боуменова мембрана с очаговой десквамацией и фрагментацией (Рисунок 118).

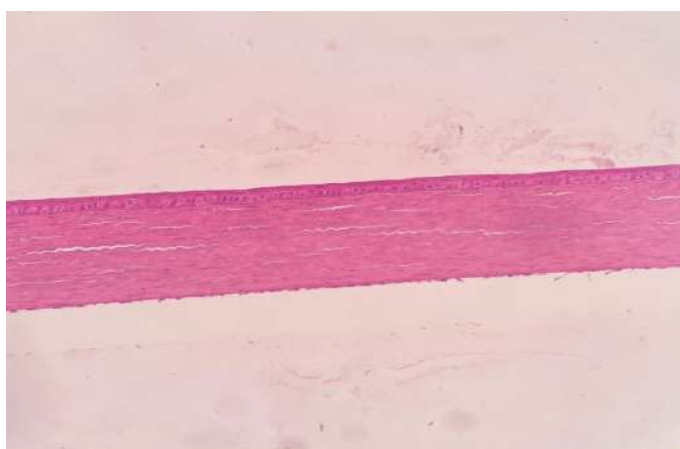


Рисунок 118 – Центральный отдел роговицы лабораторного животного группы 1 (окраска гематоксилин-эозином, увеличение x400)

Угол передней камеры: определялись фокусы деструкции цилиарного тела и его фрагментации, некротические массы, инфильтрированные сегментоядерными лейкоцитами (Рисунок 119).

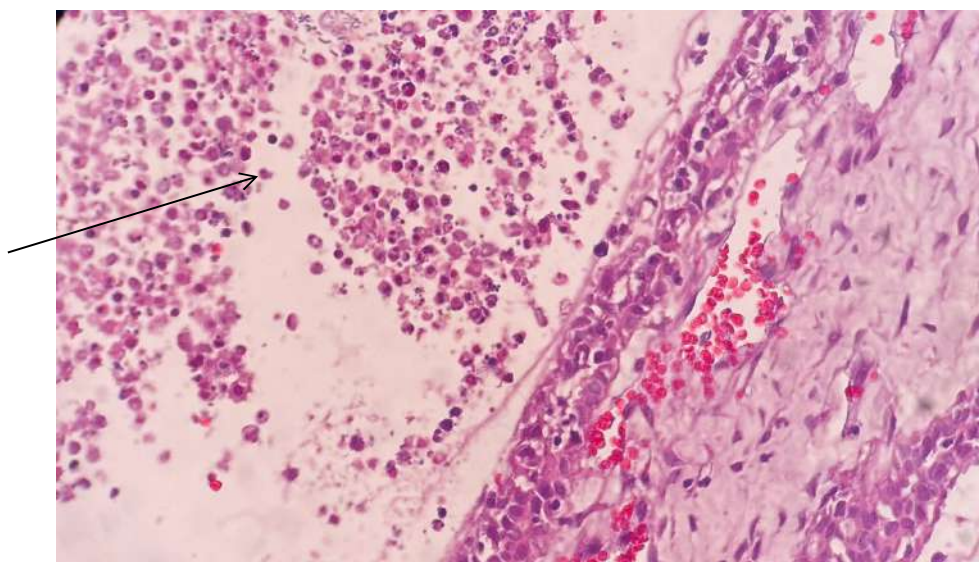


Рисунок 119 – Передняя камера глаза лабораторного животного группы 1, стрелкой обозначен гнойный экссудат (окраска гематоксилин-эозином, увеличение x400)

На *фрагментах сетчатки* с сосудистой оболочкой определялось резко выраженное полнокровие сосудов с капилляростазом. Определялись фокусы лимфоидной инфильтрации с трансмуральным распространением на сосудистую и сетчатую оболочки (Рисунок 120).

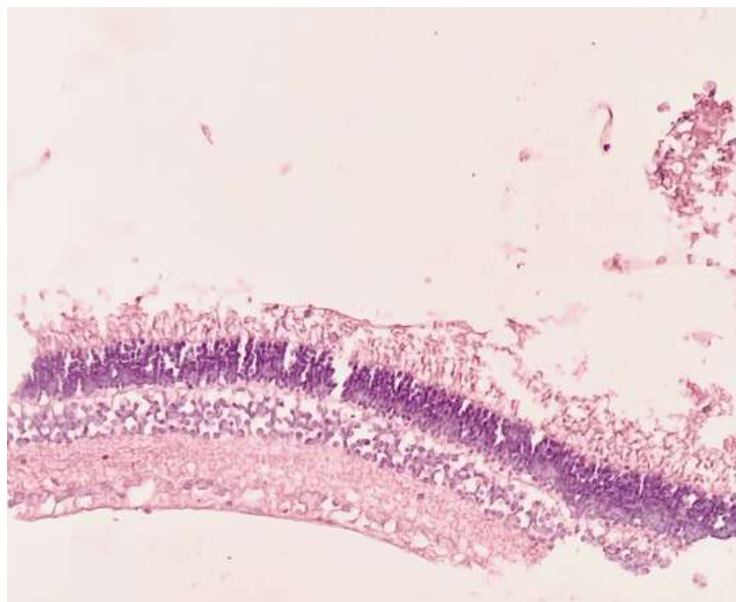


Рисунок 120 – Фрагмент сетчатки лабораторного животного группы 1 с признаками лимфоцитарно-плазмоцитарного инфильтрата (окраска гематоксилин-эозином, увеличение x400)

Стекловидное тело было представлено нитчатыми фрагментированными образованиями без признаков экссудативной реакции (Рисунок 121).



Рисунок 121 – Стекловидное тело лабораторного животного группы 1 (окраска гематоксилин-эозином, увеличение x400)

В результате, при гистологическом исследовании энуклеированных глаз подопытных животных группы 1 ($n=9$), получавших интравитреальную инъекцию 2,25 мг/0,1 мл Цефтазидима, установлено, что процессы альтерации определяются в склере, цилиарном теле и сетчатке, где преобладали процессы альтерации и сохранялись признаки экссудативного воспаления с участием палочко-ядерных лейкоцитов, которые выполняли фагоцитарную функцию (фагоцитоз некротических масс). Роговица в воспалительный процесс вовлечена крайне мало, либо наблюдаемая картина демонстрирует терапевтический патоморфоз (отсутствие воспалительного инфильтрата, слабая васкуляризация периферических отделов роговицы).

Из этого можно сделать вывод, что структуры глаза животных находились в регенеративной фазе воспалительного процесса.

В группу 2 вошли микропрепараты кроликов 4, 5, 6-й групп ($n=9$), получавших ИВВ 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 (Конъюгаты № 1-3). Группа характеризовалась наличием слабо выраженных воспалительных изменений.

Роговица: в области угла передней камеры, в месте перехода роговицы в склеру в волокнистом слое определялись полнокровные сосуды с признаками капилляростаза (Рисунок 122).

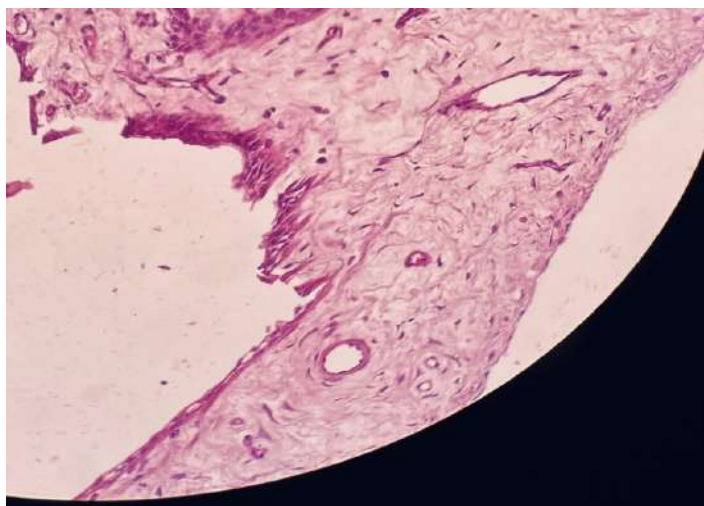


Рисунок 122 – Область угла передней камеры глаза лабораторного животного группы 2 (окраска гематоксилин-эозином, увеличение x400)

В центральной и периферической части роговицы морфологические особенности не отмечены (Рисунок 123).

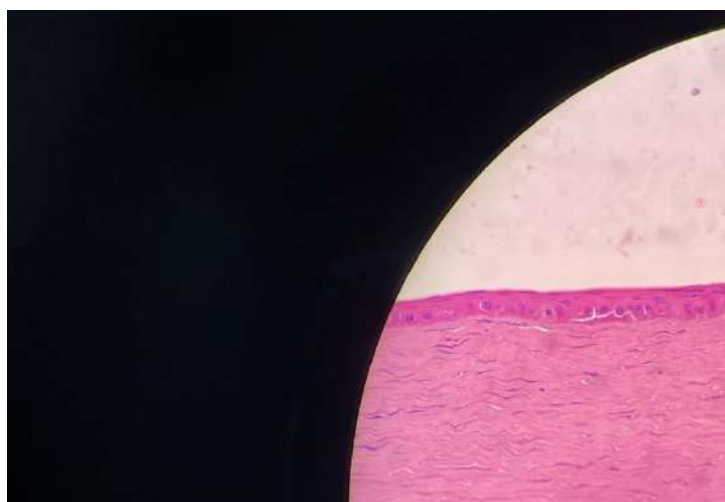


Рисунок 123 – Роговица лабораторного животного группы 2.
Центральная часть (окраска гематоксилин-эозином, увеличение x400)

В области выхода зрительного нерва в сетчатой оболочке глаза определялись полнокровие сосудов с выраженным капилляростазом, умеренный отек сетчатой оболочки.

В сетчатой оболочке определялись выраженные слои. Клетки – без видимых структурных изменений (Рисунок 124).

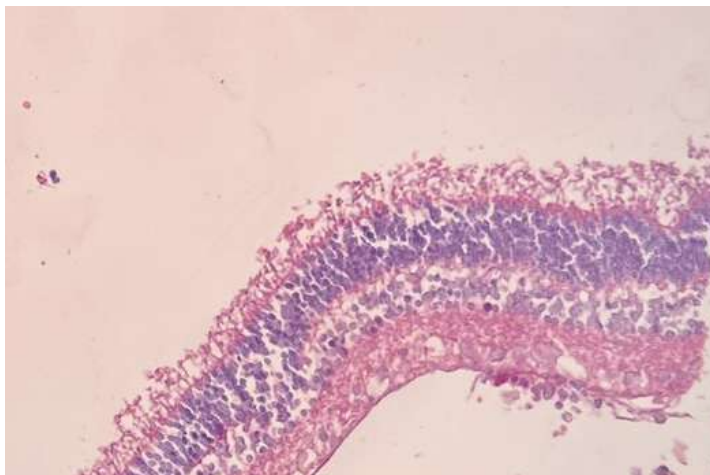


Рисунок 124 –Фрагмент сетчатки лабораторного животного группы 2 (окраска гематоксилин-эозином, увеличение x400)

Стекловидное тело было представлено нитчатыми фрагментированными образованиями без признаков экссудативной реакции.

В результате, в группе 2 (n=9) в ходе гистологического исследования энуклеированных глазных яблок были выявлены слабо выраженные признаки токсического повреждения интраокулярных структур, которые проявлялись в виде минимальных структурных изменений собственного вещества, практически без признаков экссудативной реакции, демонстрирующих регенеративную фазу воспалительного процесса.

В группу 3 вошли микропрепараты глаз кроликов 1, 2, 3-й (n=9), получавшие ИВВ раствора Ag(10%):InP/ZnS МРА 0,1 мл в стандартной (10%), 0,1% и 0,01% концентрациях, в которой не демонстрировались признаки токсического повреждения структур глаза.

Структурные изменения со стороны роговицы у кроликов были минимальны, роговичный эпителий и собственное вещество роговицы, как в центральной, так и в периферической части соответствовали гистологической норме (Рисунок 125).

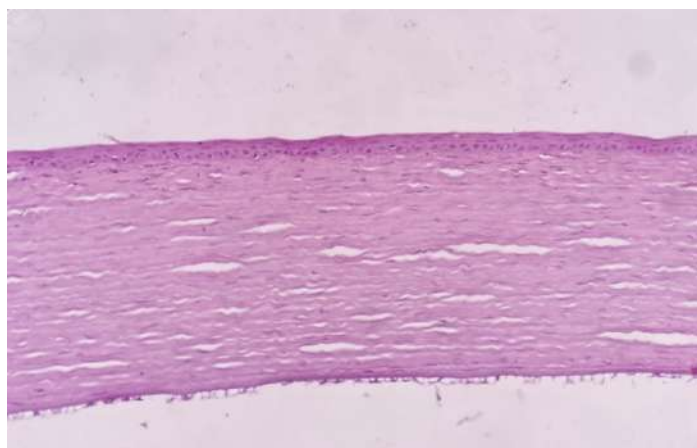


Рисунок 125 – Роговица лабораторного животного группы 3
(окраска гематоксилин-эозином, увеличение x400)

В области перехода роговицы в склеру обнаруживались единичные лимфоциты и крайне слабо выраженный отек (Рисунок 126).

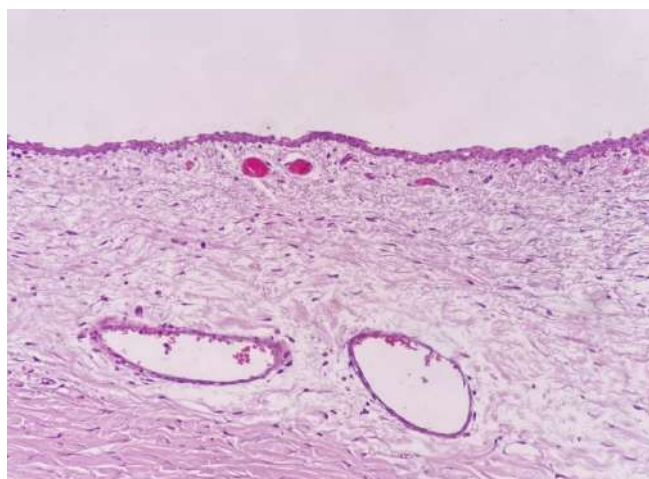


Рисунок 126 – Область угла передней камеры глаза лабораторного животного группы 3 (окраска гематоксилин-эозином, увеличение x400)

В сетчатой оболочке определялись выраженные слои. Клетки – без видимых структурных изменений (Рисунок 127).

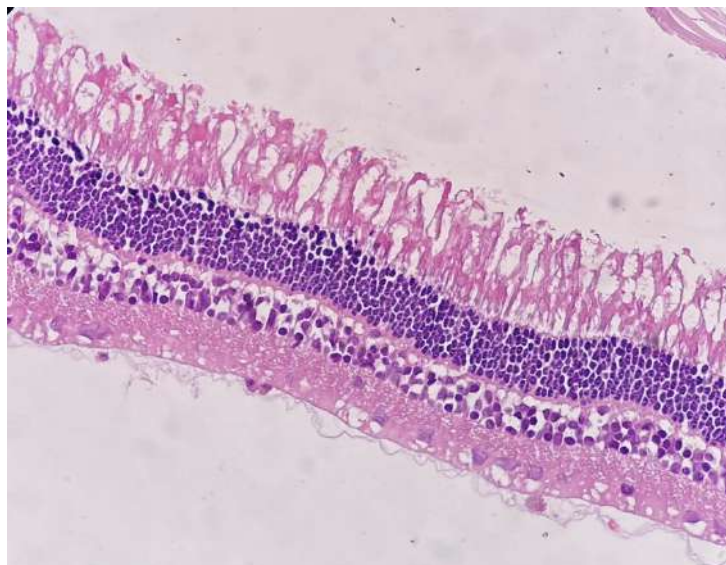


Рисунок 127 – Сетчатка лабораторного животного группы 3
(окраска гематоксилин-эозином, увеличение x400)

В задней камере глаза определялись фрагменты стекловидного тела без признаков экссудативной реакции (Рисунок 128).



Рисунок 128 – Стекловидное тело лабораторного животного группы 3
(окраска гематоксилин-эозином, увеличение x400)

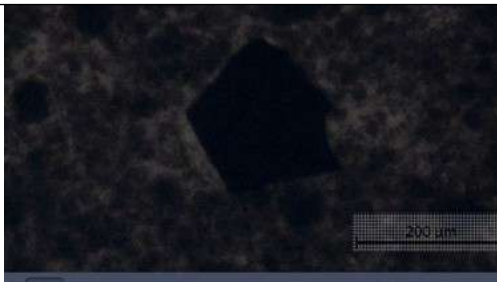
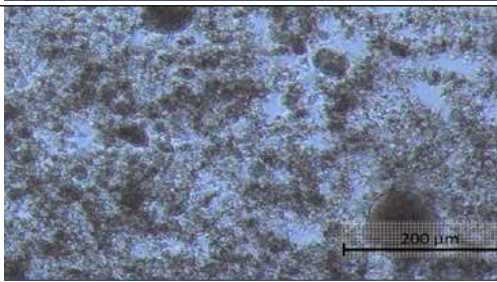
В ходе гистологического исследования энуклеированных глазных яблок кроликов в группе 3 (№ 1, 2, 3), получавших ИВВ раствора $\text{Ag}(10\%):\text{InP}/\text{ZnS}$ МРА 0,1 мл в стандартной 10%, 0,1% и 0,01% концентрациях, было выявлено отсутствие патологических изменений в интраокулярных структурах.

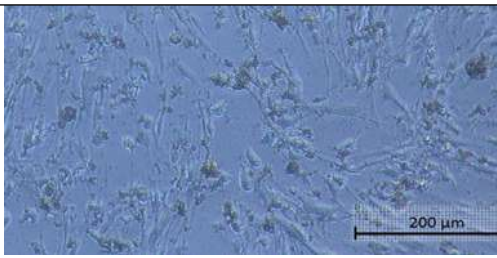
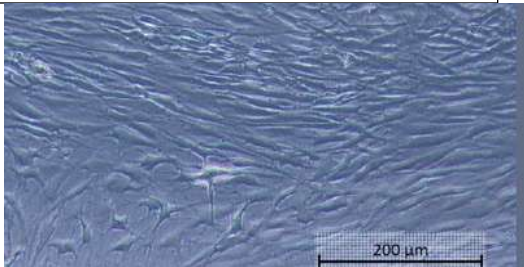
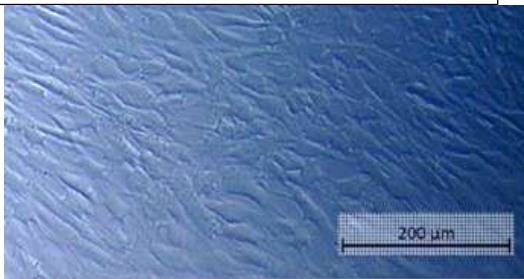
Результаты исследования клеточной безопасности

Результаты исследования цитотоксического действия тестируемых препаратов на нефиксированной культуре ЛЭЧ-4(81)

Результаты изучения цитотоксичности тестируемых препаратов в культуре клеток ЛЭЧ-4 (81) представлены в Таблицах 40-42.

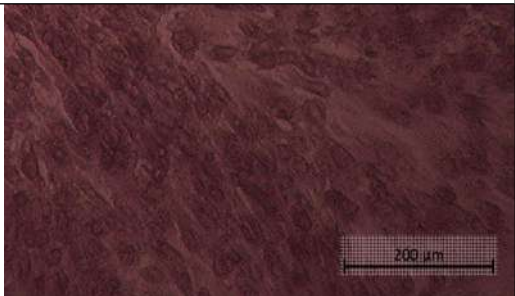
Таблица 40 – Результаты тестирования CdTe/Cd МРА 710 (КТ1) на клеточной культуре ЛЭЧ-4 (81)

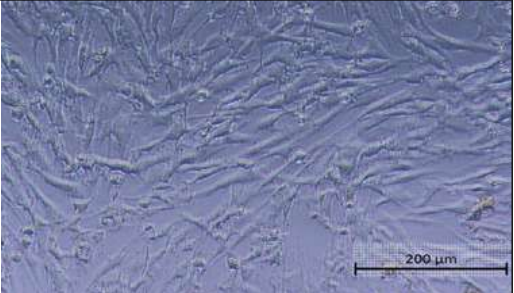
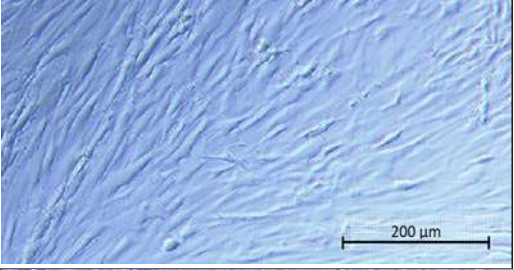
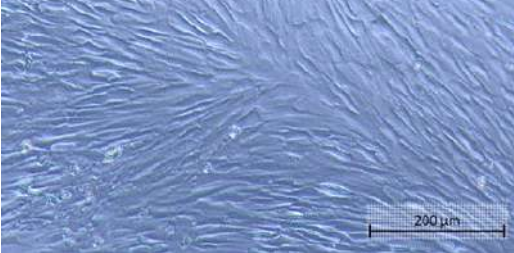
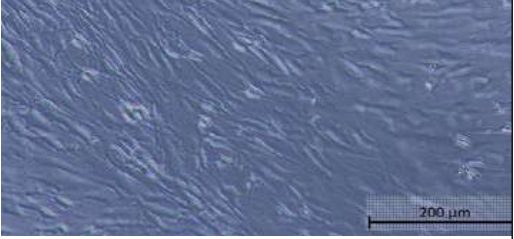
Тестируемое вещество	Концентрация тестируемого препарата, мкл/мл (%)	Цитотоксичность, балл	Изображение нефиксированных культур
CdTe/Cd МРА 710 (КТ1)	1×10^{-1} (1%)	4,0	
	1×10^{-2} (0,1%)	4,0	

	1×10^{-3} (0,01%)	2,5	
	1×10^{-4} (0,001%)	0,25	
Контроль (ЛЭЧ-4 (81))	-	-	

Квантовые точки CdTe/Cd МРА 710 (КТ1) обладают цитопатогенным действием (ЦПД) на культуре клеток ЛЭЧ-4 (81) в концентрациях 1%, 0,1% и 0,01%, что соответствует 4,0 и 2,5 баллам соответственно, проявляя при этом полную дегенерацию монослоя. Анализ культуры ЛЭЧ-4 (81) и КТ в разведении 0,001% определили минимальные изменения монослоя, что соответствовало 0,25 балла.

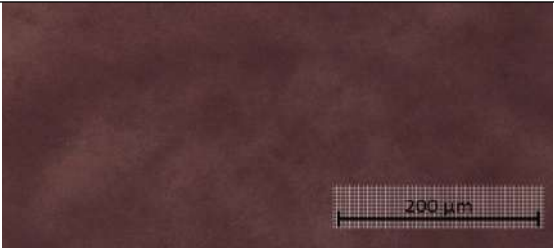
Таблица 41 – Результаты тестирования Ag (10%) InP/ZnS МРА 710 (КТ2) на клеточной культуре ЛЭЧ-4(81)

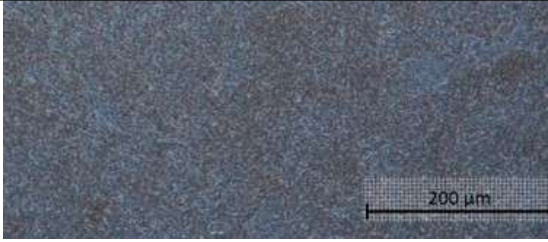
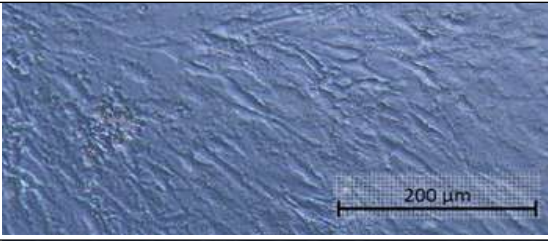
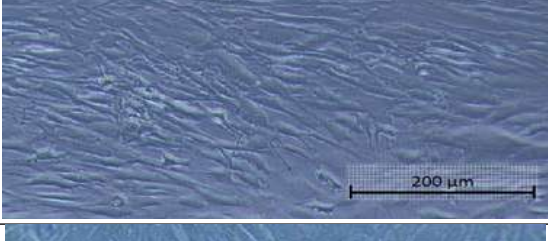
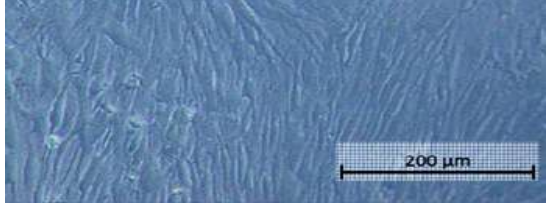
Тестируемое вещество	Концентрация тестируемого препарата, мкл/мл (%)	Цитотоксичность, балл	Изображение нефиксированных культур
Ag (10%) InP/ZnS МРА 710 (КТ2)	1×10^{-1} (1%)	4,0	

	1×10^{-2} (0,1%)	1,0	
	1×10^{-3} (0,01%)	0,25	
	1×10^{-4} (0,001%)	0	
Контроль (ЛЭЧ-4(81))	-	-	

Квантовые точки Ag (10%) InP/ZnS МРА 710 (КТ2) обладают цитопатогенным действием на культуре клеток ЛЭЧ-4 (81) в концентрациях 1,0% (4 балла) и 0,1% (1,0 балл). В разведении 0,01% и 0,001% оно отсутствует.

Таблица 42 – Результаты тестирования InP/ZnSe/ZnS 650 МРА (КТ3) на клеточной культуре ЛЭЧ-4

Тестируемое вещество	Концентрация тестируемого препарата, мкл/мл (%)	Цитотоксичность, балл	Изображение нефиксированных культур
InP/ZnSe/ZnS 650 МРА (КТ3)	1×10^{-1} (1%)	4,0	

	1×10^{-2} (0,1%)	4,0	
	1×10^{-3} (0,01%)	1,5	
	1×10^{-4} (0,001%)	0,5	
Контроль (ЛЭЧ-4(81))	-	-	

Квантовые точки InP/ZnSe/ZnS 650 МРА (КТ3) обладают цитопатогенными действиями на культуре клеток ЛЭЧ-4(81) в концентрациях 1,0%, 0,1%, 0,01%, в разведении 0,001% оно отсутствует.

В результате проведенного исследования при изучении токсического действия (допустимо до 0,5 баллов) тестируемых препаратов на монослое ЛЭЧ-4 (81) было выявлено, что квантовые точки CdTe/Cd МРА 710 (КТ1) и InP/ZnSe/ZnS 650 МРА (КТ3) не обладают цитопатогенным действием в концентрации 0,001%, КТ Ag (10%) InP/ZnS МРА 710 (КТ2) – в концентрациях 0,01%, т.е. последние обладают наибольшим спектром для практического применения.

Результаты определения цитотоксичности тестируемых препаратов МТТ-тестом на культуре клеток (метаболическая активность клеток)

Для изучения прямой цитотоксичности исследуемых соединений использовался МТТ-тест, который имеет широкое распространение в экспериментальных исследованиях. Исследуемые соединения CdTe/Cd МРА 710, Ag (10%) InP/ZnS МРА 710, InP/ZnSe/ZnS 650 МРА тестировались в диапазоне концентраций 0,1-0,0001 мкг/мл в трех параллельных сравнениях (для каждой концентрации) в трех сериях экспериментов. Среднее значение для трех измерений уровня оптической плотности (эквивалент доли метаболически активных/жизнеспособных клеток) выражали в процентах к контролю.

Полученные результаты указывают, что CdTe/Cd МРА 710, Ag (10%) InP/ZnS МРА 710, InP/ZnSe/ZnS 650 МРА проявляют выраженный дозозависимый цитотоксический эффект (Рисунок 129).

Наибольшее негативное воздействие на митохондриальный аппарат клеток в культуре ЛЭЧ-4(81) оказывали квантовые точки InP/ZnSe/ZnS 650 МРА ($13,536 \pm 0,66$) в дозе 0,1 мкг/мл (Таблица 43).

Наименьшим токсическим действием при аналогичной концентрации обладают Ag (10%) InP/ZnS МРА 710 ($7,055 \pm 0,22$).

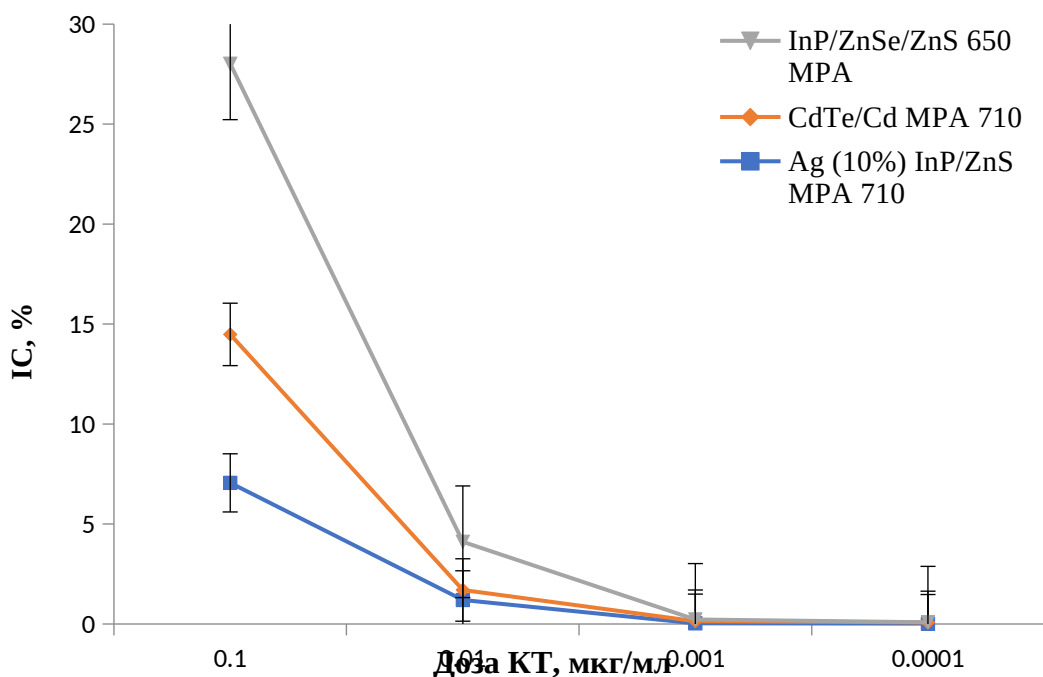


Рисунок 129 – Зависимость индекса цитотоксичности (cytotoxicity index, IC) квантовых точек CdTe/Cd MPA 710, Ag (10%) InP/ZnS MPA 710, InP/ZnSe/ZnS 650 MPA от их дозы

Таблица 43 – Индекс цитотоксичности, %

Исследуемые вещества	Дозы мкг/мл (%)			
	0,1	0,01	0,001	0,0001
CdTe/Cd	7,375	0,551	0,109	0,085
	7,472	0,463	0,103	0,043
	7,258	0,492	0,107	0,052
	7,425±0,048	0,502±0,045	0,107±0,003	0,060±0,022
Ag (10%) InP/ZnS	7,269	1,140	0,023	0,019
	6,823	1,258	0,045	0,027
	7,073	1,206	0,032	0,014
	7,055±0,224	1,202±0,059	0,033±0,011	0,020±0,006
InP/ZnSe/ZnS	14,285	2,517	0,096	0,016
	13,023	2,327	0,045	0,006
	13,300	2,379	0,119	0,009
	13,536±0,663	2,408±0,098	0,087±0,038	0,011±0,005

МТТ-тест показал, что в дозе 0,001 мкг/мл исследуемых веществ (CdTe/Cd MPA 710, Ag (10%) InP/ZnS MPA 710, InP/ZnSe/ZnS 650 MPA) диапазон индекса цитотоксичности на клеточную культуру ЛЭЧ-4(81) составил от 0,011±0,005 до 0,060±0,022%, что подтверждает отсутствие выраженной токсичности препаратов *in vitro*.

По данным U-критерия различия между опытными и контрольной группами статистически достоверны при уровне значимости ($p \leq 0,05$).

Результаты МТТ-теста согласуются с результатами анализа исследования цитотоксического действия тестируемых квантовых точек на нефиксированной культуре ЛЭЧ-4 (81).

Таким образом, в ходе изучения клеточной и тканевой безопасности применения квантовых точек и конъюгатов на их основе в лечении антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза посредством цитологических и гистоморфологических методов исследования установлено,

что исследуемые КТ во всех концентрациях не вызывают гистоморфологических изменений в чистом виде, так и в составе конъюгатов с исследуемыми АБ (концентрация от 10 до 0,01%). Однако по данным цитологических методов исследования безопасной для исследуемых КТ является концентрация равная 0,01% и ниже.

В данной главе диссертационного исследования было проведено лабораторное и клинико-экспериментальное обоснование эффективности использования квантовых точек и конъюгатов на их основе в лечении антибиотикорезистентных инфекций глаза, а также доказана безопасность их применения в офтальмологической практике посредством изучения их влияния на организм лабораторных животных на анатомическом, функциональном, тканевом и клеточном уровнях. Установлено *in vitro*, что КТ обладают выраженной антиинфекционной активностью в отношении актуальных возбудителей глазных инфекций, в том числе антибиотикорезистентных; экспериментально доказана антибактериальная активность квантовых точек и конъюгатов на их основе в отношении антибиотикорезистентной G^+ и G^- микрофлоры путем проведения моделирования инфекционного воспалительного процесса на переднем и заднем отрезках глаза у лабораторных животных; исследована и доказана клеточная, тканевая, анатомическая и функциональная безопасность квантовых точек и конъюгатов на их основе с помощью клинических, функциональных, гистоморфологических и цитологических методов исследования на лабораторных животных.

Глава 6. ФАРМАКОЭКОНОМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.

РАЗРАБОТКА ТРЕБОВАНИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

Целью данной главы явилась многоуровневое изучение требований для разработки лекарственного препарата на основе квантовых точек, а также определение его места в системе фармакотерапии антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза с проведением фармакоэкономического анализа.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить ряд задач:

- разработать требования для создания лекарственного препарата с использованием квантовых точек и конъюгатов на их основе для применения в офтальмологической практике;
- разработать систему фармакотерапии антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза с учетом места в ней разработанной технологии лечения;
- провести фармакоэкономический анализ разработанной технологии лечения для оценки затрат и прогнозирования эффективности предложенного подхода к терапии антибиотикорезистентных инфекций глаза.

6.1. Требования для создания лекарственного препарата с использованием квантовых точек и конъюгатов на их основе для применения в офтальмологической практике

В основе парадигмы создания лекарственного препарата для лечения антибиотикорезистентных инфекций глаза бактериальной этиологии лежит многокомпонентная совокупность исследований, проведенных в ходе диссертационной работы, которые обобщены в блоки для удобства восприятия. Блоки приведены ниже.

1. Ориентированность на офтальмопатологию

В ходе фундаментального этапа диссертационной работы было сформировано техническое задание для производителя КТ. В основу требований были заложены оптимальные физико-химические и биологические характеристики КТ, ориентированные на применение в офтальмологической практике, а именно:

- синтезируемые КТ должны содержать в своем составе металлы, обладающие потенциальными антиинфекционными свойствами (например, 1% серебро);

- предельный диаметр КТ не должен превышать 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 могут присутствовать только защищенные полупроводники, не обладающие токсическими свойствами во время полураспада молекулы;

- в качестве растворителя массы вещества КТ должна использоваться вода, для возможности эпibuльбарного и интравитреального использования;

- квантовый выход флуоресценции не должен превышать 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 должен быть 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 должна быть выполнена химически активными карбоксильными или аминными группами, для увеличения их реакционной способности;

- для улучшения химической стабильности КТ и уменьшения периода полураспада поверхность должна быть обработана 3-меркаптопропионовой кислотой.

На основании поставленных требований производителем были синтезированы три типа КТ, которые полностью соответствовали задачам заказчика и легли в основу требований для разработки лекарственного препарата – изложены в главе 4 диссертационного исследования.

2. Эффективность

Требование к эффективности КТ 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 ДГРМ; 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, что отражено в главе 4 диссертации. Также в пользу эффективности свидетельствуют данные, полученные в ходе экспериментального взаимодействия КТ с бактериальной клеткой по данным растровой/просвечивающей электронной микроскопии, в ходе которого доказано, что КТ обладают потенциалом к проникновению непосредственно во внутриклеточное пространство через сформированные мембранные каналы. Механизмы, происходящие в клетке после проникновения КТ, сопровождаются ее полным разрушением, предположительно физико-химической основой которых являются процессы образования АФК посредством химической активности КТ, что также изложено в главе 4 диссертационной работы.

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, вызванного антибиотикорезистентной Гр⁻ и Гр⁺ микрофлорой на лабораторных животных и отражено в главе 5 диссертационного исследования.

3. Безопасность

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 разработанной технологии лечения антибиотикорезистентных инфекций глазного яблока и изложено в главе 5 диссертации.

4. Простота изготовления

Требование по простоте изготовления конъюгатов на основе КТ реализовано посредством смешивания вышеописанных растворов КТ с АБ, используемыми в офтальмологической практике, и изложено в главе 4 диссертации. Зависимость формы доставки регламентирует особенности подготовки доз для реализации лечебного процесса по формулам:

- передний отрезок:

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

- задний отрезок:

$$\text{КТ (x) } 0,01\%/0,05 \text{ мл} + \text{АБ (y) } (1\text{мг}/2,25 \text{ мг})/0,05 \text{ мл} = \text{КТ/АБ (z) } 0,01\%/0,1 \text{ мл}$$

5. Простота использования

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

6. Экономическая обоснованность

Требование по экономической обоснованности реализовано посредством проведения фармакоэкономических расчетов по перспективности применения разработанной технологии лечения, которые продемонстрировали положительный экономический компонент и будут изложены в данной главе диссертации.

Таким образом, на основании результатов, полученных в ходе диссертационного исследования, были сформированы и научно обоснованы требования к разработке лекарственного препарата с использованием КТ и конъюгатов на их основе для применения в офтальмологической практике. Сформулированные требования должны отвечать и отвечают следующим критериям: ориентированность на офтальмопатологию; эффективность; безопасность; простота изготовления, простота использования, экономическая обоснованность.

6.2. Разработка системы фармакотерапии антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза на основании разработанной технологии лечения

Разработанные методы фармакотерапии антибиотикорезистентной внутриглазной инфекции.

На основании данных литературного обзора, на сегодняшний день этиотропная терапия внутриглазной инфекции заключается в одномоментном интравитреальном введении (ИВВ) двух АБ. Первый представляет собой АБ

из группы гликопептидов (Ванкомицин в дозировке 1 мг/0,1 мл); второй – цефалоспорин III поколения (Цефтазидим в дозировке 2,25 мг/0,1 мл).

Данная комбинация АБ зарекомендовала себя в качестве средств, способных перекрывать весь спектр возможных возбудителей внутриглазной инфекции, обладающих чувствительностью к применяемым химиотерапевтическим агентам.

Ванкомицин, в частности, проявляет преимущественную активность в отношении грамположительных микроорганизмов – *Staphylococcus* spp. (включая штаммы, продуцирующие пенициллиназу и метициллин-резистентные штаммы), *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Listeria* spp., *Actinomyces* spp., *Clostridium* spp. (в т.ч. *Clostridium difficile*), путем нарушения синтеза клеточной стенки, проницаемости цитоплазматической мембраны и синтеза РНК бактерий.

Цефтазидим, напротив, обладает наиболее выраженной активностью в отношении грамотрицательных микроорганизмов, таких как *Haemophilus influenzae*, *Neisseria* spp. (в т.ч. *Neisseria gonorrhoeae*), *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. (в т.ч. *Klebsiella pneumoniae*), *Morganella* spp. (в т.ч. *Morganella morganii*), *Proteus* spp. (в т.ч. *Proteus mirabilis* / индол-положительные штаммы/, *Proteus vulgaris*), *Providencia* spp. (в т.ч. *Providencia rettgeri*), *Serratia* spp., *Acinetobacter* spp., *Haemophilus parainfluenzae* (включая штаммы, устойчивые к ампициллину), *Pasteurella multocida*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*; и некоторой активностью в отношении грамположительной микрофлоры – *Micrococcus* spp., *Streptococcus* spp. (в т.ч. *Streptococcus aureus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* группы А, *Streptococcus viridans* /исключая *Streptococcus faecalis*/), метициллин-чувствительных штаммов *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*.

Классическая схема терапии посредством вышеописанных АБ реализуется посредством однократного внутриглазного (интравитреального) введения. Учитывая средний объем витреальной полости, равный 5 мл,

пиковая концентрация вышеуказанных АБ в полости глаза в сотни раз превосходит минимальные ингибирующие и минимальные бактерицидные концентрации чувствительных штаммов.

Как правило, однократного ИВВ АБ достаточно для эрадикации штаммов в силу того, что скорость эвакуации АБ из витреальной полости позволяет сохранять их пиковые концентрации на достаточном уровне, чтобы гарантированно уничтожить возбудителя инфекционного процесса.

Однако в случаях инфекционного процесса, обусловленного штаммами с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) или не чувствительной флорой, возникают высокие риски функциональной/анатомической потери зрительного анализатора, обусловленные отсутствием возможности коррективной этиотропной терапии, обусловленные рядом причин:

1) в случаях недостаточного клинического ответа, множественные интравитреальные инъекции АБ могут привести к риску развития токсического повреждения интраокулярных структур;

2) отсутствуют клинически одобренные АБ для лечения внутриглазных офтальмологических инфекций, которые можно было бы использовать в качестве резерва;

3) как правило, результаты бактериологического посева, которые берутся на старте антиинфекционной терапии, не дают преимущества для выбора АБ резерва в силу обстоятельств, описанных в предыдущем пункте.

В этой связи, этиотропная терапия инфекций, обусловленная штаммами с МЛУ или не чувствительной микрофлорой, а также, вероятно, имеющая атипичные клинические проявления требует разработки методов фармакотерапии антибиотикорезистентных инфекций глазного яблока, в основе которой лежит разработанная технология лечения.

На сегодняшний день, реализация разработки дифференцированного подхода к методу фармакотерапии внутриглазных инфекций, обусловленных антибиотикорезистентной микрофлорой, возможна на основании:

- 1) клинических проявлений;
- 2) результатов бактериологического посева;
- 3) анализа уровня клинического ответа на базовую терапию.

Клинические проявления

В случаях ранних клинических проявлений (менее 24-48 часов) от даты предполагаемой интраокулярной контаминации (оперативное вмешательство, травма и т.д.), высокой интенсивности жалоб и выраженной клинической симптоматики рекомендуется начинать антиинфекционную терапию с предложенной технологии лечения.

Результаты бактериологического посева

В случаях выявления возбудителя, демонстрирующего резистентность к вышеописанным АБ, а также в ситуациях, когда минимальная ингибирующая концентрация АБ превышает 16-32 мкг/мл, аналогичным образом необходимо использовать предложенную технологию лечения. Основанием к данному подходу является отношение Ванкомицина и Цефтазидима к АБ с времязависимым эффектом, говорящее о том, что сверхвысокие дозы АБ, находящиеся в витреальной полости после ИВВ, не гарантируют увеличения их антимикробной активности, а напротив способны привести к риску развития токсического повреждения интраокулярных структур при попытке поддержать сверхвысокие концентрации в определенном временном промежутке.

Анализ уровня клинического ответа на базовую антиинфекционную терапию

В случаях отсутствия клинического ответа в отношении обратного развития симптомов внутриглазной инфекции при использовании базовой терапии вышеописанными АБ – через 24-48 часов (1-2 суток) возможно переключение на новую технологию лечения. Временной интервал, равный 48 часам, минимизирует риск токсического повреждения интраокулярных

структур, что обусловлено эвакуацией Ванкомицина и Цефтазидима из витреальной полости. Также, 48-часовой интервал является достаточным для оценки клинического ответа на лечение.

Показания для проведения витрэктомии (эвакуация патологического субстрата из витреальной полости) не зависят от тактических подходов в лечении пациентов с внутриглазной инфекцией.

В результате, 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 используется 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.

В результате раствор для ИВВ 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.

При данной разработанной технологии КТ выступают в качестве дополнительного синергетического компонента, имеющего альтернативный используемый механизм действия, который заключается в способности к разрушению клеточной стенки и цитоплазматической мембраны бактериальных клеток, управляемой выработке активных АФК, приводящих к окислительному стрессу, за которыми следуют, в меньшей степени, ферментативное ингибирование, изменения экспрессии генов и дезактивация белков патогенной микрофлоры.

Блок-схема методов фармакотерапии антибиотикорезистентных внутриглазных инфекций на основании разработанной технологии лечения представлена на Рисунке 130.



Рисунок 130 – Блок-схема методов фармакотерапии
антибиотикорезистентных внутриглазных инфекций на основании
разработанной технологии лечения

Разработанные методы фармакотерапии антибиотикорезистентной инфекции переднего отрезка глаза

Базовая этиотропная терапия инфекций переднего отрезка в основном реализуется посредством эпибульбарных инстилляций АБ широкого спектра действия в различных вариациях (кратность инстилляций и продолжительность лечения), однако, в среднем, не затяжное течение инфекционного кератита, обусловленного чувствительной(!) микрофлорой, продолжается около 7-14 дней, конъюнктивита – 5-10 дней. Кратность инстилляций АБ при этом составляет от 4 до 8 раз в день в нижний конъюнктивальный свод.

Такой режим лечения обеспечивает высокую концентрацию АБ в конъюнктиве, слоях роговицы, а периодичность закапывания позволяет поддерживать минимальную ингибирующую концентрацию на высоком уровне во всех интересующих анатомических областях глазного яблока.

На сегодняшний день препаратами выбора для лечения инфекций переднего отрезка являются глазные формы фторхинолонов, в частности, Левофлоксацин и аминогликозидов – Тобрамицин. Несмотря на разные механизмы действия, спектры противомикробной активности, вышеописанные АБ зарекомендовали себя крайне положительно в рутинной офтальмологической практике при лечении инфекционных заболеваний переднего отрезка глаза.

Общеизвестно, что в случаях негативного клинического ответа на проводимую терапию посредством применения глазных форм АБ возможно:

- 1) переключение на АБ другой группы, при отсутствии регресса симптомов на 2-5-е сутки лечения;
- 2) добавление в схему лечения двух АБ препаратов, желательно из разных групп с альтернативным механизмом действия;
- 3) подключение к проводимой терапии других способов доставки АБ – субконъюнктивальные/ретробульбарные инъекции, системное применение АБ.
- 4) хирургические методы лечения (послойная или сквозная кератопластика).

Естественно, данные вопросы напрямую сопряжены с антибиотикорезистентной микрофлорой, которая аналогичным образом может иметь новые перспективные методы эрадикации, минимизирующие сроки реабилитации и затраты на здравоохранение.

Предлагаемая схема фармакотерапии антибиотикорезистентных инфекций переднего отрезка на основании разработанной технологии лечения заключается в комбинированном применении вышеописанных АБ (Левофлоксацин, Тобрамицин) и КТ.

Процесс приготовления комплекса заключается в добавлении к 5 мл нативного раствора АБ (во флакон) 0,05% раствора КТ в объеме 1 мл (для получения концентрации 0,01%).

В качестве КТ используется любой из трех видов, изучаемых в диссертационном исследовании: КТ CdTe/Cd 710 МРА; КТ InP/ZnSe/ZnS 650 МРА; КТ Ag(10%):InP/ZnS МРА.

Предлагаемый дифференцированный подход заключается в переключении пациента с базовой АБ-терапии на разработанную технологию лечения при отсутствии клинического ответа на лечение на протяжении 48-72 часов.

Блок-схема методов фармакотерапии антибиотикорезистентных инфекций переднего отрезка на основании разработанной технологии лечения представлена на Рисунке 131.



Рисунок 131 – Блок-схема методов фармакотерапии антибиотикорезистентной инфекции переднего отрезка на основании разработанной технологии лечения

Таким образом, на основании существующих моделей определено место разработанной технологии в системе фармакотерапии антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза, разработанные и обоснованные

методы фармакотерапии антибиотикорезистентной внутриглазной инфекции соответствуют современным представлениям о стратегиях лечения инфекционных заболеваний, в основе которых лежит комплексный подход, основанный на клинических проявлениях заболевания, динамике обратного развития симптомов, результатах бактериологического посева, уровне ответа на стартовую антиинфекционную терапию.

6.3. Фармакоэкономический анализ новой технологии лечения бактериальной антибиотикорезистентной инфекции глаза

Внутриглазная инфекция

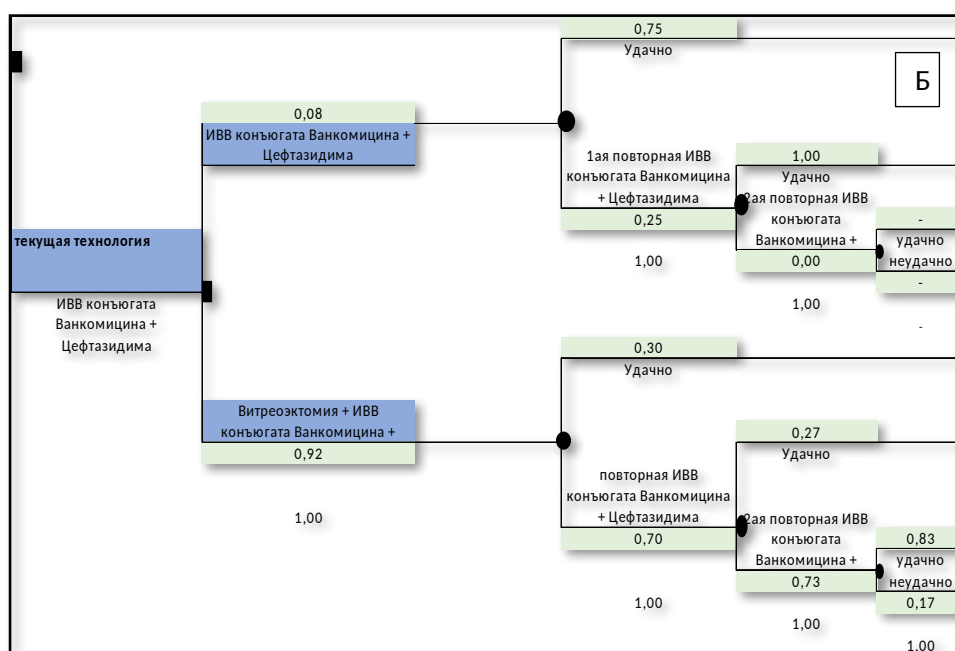
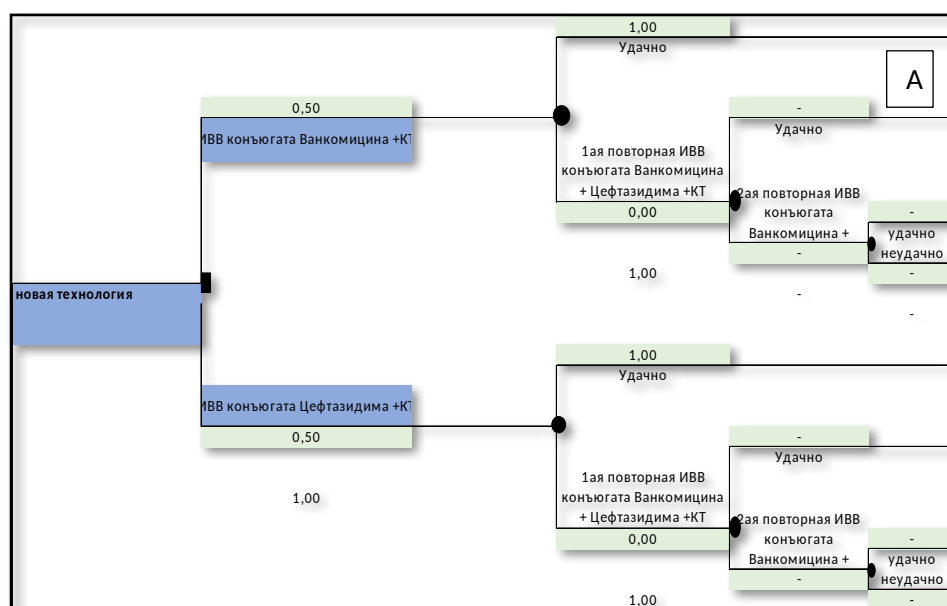
Технологические и клинические аспекты ведения пациента с антибиотикорезистентной внутриглазной инфекцией, подразумевают (как было описано выше) необходимость госпитализации, оперативного вмешательства, направленного на эвакуацию патологического содержимого из витреальной полости (витрэктомия), с забором содержимого витреальной полости, а также выполнение ИВВ АБ (не менее 1 раза за курс лечения) с последующим медикаментозным сопровождением пациента в период долечивания в стационаре.

Результаты ретроспективного анализа клинической группы (n=100) с проявлениями острого эндофтальмита (ранее проведенная «стандартная» терапия) в сочетании с заложенной процентной вероятностью развития событий по разработанной технологии лечения изложены в Таблице 44.

Таблица 44 – Процентная вероятность ретроспективной «стандартной» и моделируемой разработанной (новой) технологий лечения острого эндофтальмита

Вероятности	%
новая технология	
ИБВ конъюгата Ванкомицина +КТ	50,00%
ИБВ конъюгата Цефтазидима +КТ	50,00%
вероятность успешной ИБВ конъюгата Ванкомицина + КТ	100,00%
вероятность повтора процедуры ИБВ конъюгата Ванкомицина + КТ	0,00%
вероятность успешной 1ой повторной ИБВ конъюгаты Ванкомицина + КТ	0,00%
вероятность повтора процедуры после 1ой повторной ИБВ конъюгаты Ванкомицина + КТ	0,00%
вероятность успешной 2ой ИБВ конъюгаты Ванкомицина + КТ	0,00%
вероятность неудачи 2ой повторной процедуры ИБВ конъюгаты Ванкомицина + КТ/потеря	0,00%
вероятность успешной ИБВ конъюгата Цефтазидима + КТ	100,00%
вероятность повтора процедуры ИБВ конъюгата Цефтазидима + КТ	0,00%
вероятность успешной 1ой повторной ИБВ конъюгаты Цефтазидима + КТ	0,00%
вероятность повтора процедуры после 1ой повторной ИБВ конъюгаты Цефтазидима + КТ	0,00%
вероятность успешной 2ой ИБВ конъюгаты Цефтазидима + КТ	0,00%
вероятность неудачи 2ой повторной процедуры ИБВ конъюгаты Цефтазидима + КТ/потеря	0,00%
стандартная терапия	
вероятность назначения Витреоэктомия + ИБВ конъюгата Ванкомицина + Цефтазидима	92,00%
вероятность назначения ИБВ конъюгата Ванкомицина + Цефтазидима	8,00%
вероятность удачной ИБВ конъюгата Ванкомицина + Цефтазидима	75,00%
вероятность 1ой повторной ИБВ конъюгаты Ванкомицина + Цефтазидима	25,00%
вероятность успешной 1ой повторной ИБВ конъюгата Ванкомицина + Цефтазидима	100,00%
вероятность 2ой повторной ИБВ конъюгаты Ванкомицина + Цефтазидима	0,00%
вероятность успешной 2ой повторной ИБВ конъюгата Ванкомицина + Цефтазидима	0,00%
вероятность неудачи 2ой повторной ИБВ конъюгата Ванкомицина + Цефтазидима/потеря	0,00%
вероятность удачной Витреоэктомия + ИБВ конъюгата Ванкомицина + Цефтазидима	30,43%
вероятность промывания и повторной ИБВ конъюгата Ванкомицина + Цефтазидима	69,57%
вероятность успешных промывания и повторной ИБВ конъюгата Ванкомицина + Цефтази,	26,56%
вероятность повторного промывания и 2ой повторной ИБВ конъюгата Ванкомицина + Це	73,44%
вероятность успешных повторного промывания и 2ой повторной ИБВ конъюгата Ванкоми	82,98%
потеря глаза	17,02%

На основании заложенной процентной вероятности сформировано древо решений с учетом тарифов ТППГ и затрат медицинской организации на оказание медицинской помощи по данной нозологии, которое отображено на Рисунке 132.



А – разработанная (новая) технология лечения;

Б – «стандартная» технология лечения. Ретроспективный анализ

Рисунок 132 – Древо решений

Фармакоэкономический анализ проводимого лечения внутриглазной инфекции посредством **разработанной технологии** методом «анализ затраты-эффективность» на 1000 пациентов в рамках ТПГГ составляет **21 363 470,00 Р**, при моделируемом отсутствии рисков потери глаза как органа (Таблица 45).

Таблица 45 – Фармакоэкономический анализ проводимого лечения внутриглазной инфекции посредством разработанной технологии в рамках ТПГГ

1000 Когорта пациентов			
	Вероятность пути	Ожидаемое кол-во пациентов	Ожидаемые затраты
новая технология			
излечение	50,0%	500	10 681 735,00 Р
излечение	0,0%	0	- Р
излечение	0,0%	0	- Р
потеря глаза	0,0%	0	- Р
излечение	50,0%	500	10 681 735,00 Р
излечение	0,0%	0	- Р
излечение	0,0%	0	- Р
потеря глаза	0,0%	0	- Р
Потеря глаза совокупно		0	
Сумма	100,0%	1 000	21 363 470,00 Р
Предотвращенные потери глаза		1 000	

Фармакоэкономический анализ проводимого лечения внутриглазной инфекции посредством **«стандартной» технологии** методом «анализ затраты-эффективность» на 1000 пациентов в рамках ТПГГ составляет **89 035 374,00 Р**, с учетом ретроспективных данных – 8 энуклеаций глазного яблока за период анализа данных (Таблица 46).

Таблица 46 – Фармакоэкономический анализ проводимого лечения внутриглазной инфекции посредством «стандартной» технологии в рамках ТПГГ

излечение	6,00%	60	1 635 624,60 Р
излечение	2,00%	20	545 208,20 Р
излечение	0,0%	0	- Р
потеря глаза	0,0%	0	- Р
излечение	28,00%	280	26 433 990,80 Р
излечение	17,00%	170	16 049 208,70 Р
излечение	39,00%	390	36 818 772,90 Р
потеря глаза	8,00%	80	7 552 568,80 Р
Потеря глаза совокупно		80	
Сумма	100,0%	1 000	89 035 374,00 Р
Предотвращенные потери глаза		920	

В свою очередь, фармакоэкономический анализ проводимого лечения внутриглазной инфекции посредством **разработанной технологии** лечения методом «анализ затраты-эффективность» на 1000 пациентов в рамках затрат медицинской организации составляет **33 555 100,00 Р**, без расчетной потери глаза как органа соответственно (Таблица 47).

Таблица 47 – Фармакоэкономический анализ проводимого лечения внутриглазной инфекции посредством разработанной технологии в рамках затрат медицинской организации

1000 Когорта пациентов			
	Вероятность пути	Ожидаемое кол-во пациентов	Ожидаемые затраты
новая технология			
излечение	50,0%	500	16 777 550,00 Р
излечение	0,0%	0	- Р
излечение	0,0%	0	- Р
потеря глаза	0,0%	0	- Р
излечение	50,0%	500	16 777 550,00 Р
излечение	0,0%	0	- Р
излечение	0,0%	0	- Р
потеря глаза	0,0%	0	- Р
Потеря глаза совокупно		0	
Сумма	100,0%	1 000	33 555 100,00 Р
Предотвращенные потери глаза		1 000	

При лечении внутриглазной инфекции посредством «стандартной» технологии затраты медицинской организации составляют **136 118 217,10 Р**, с аналогичным числом проведенных энуклеаций (Таблица 48).

Таблица 48 – Фармакоэкономический анализ проводимого лечения внутриглазной инфекции посредством «стандартной» технологии в рамках затрат медицинской организации

излечение	6,00%	60	2 013 006,00 ₽
излечение	2,00%	20	1 403 005,00 ₽
излечение	0,0%	0	- ₽
потеря глаза	0,0%	0	- ₽
излечение	28,00%	280	27 132 008,40 ₽
излечение	17,00%	170	22 695 030,60 ₽
излечение	39,00%	390	66 339 128,70 ₽
потеря глаза	8,00%	80	16 536 038,40 ₽
Потеря глаза совокупно		80	
Сумма	100,0%	1 000	136 118 217,10 ₽
Предотвращенные потери глаза		920	

На основании полученных данных в ходе фармакоэкономического анализа разработанной и «стандартной» технологий лечения внутриглазной инфекции расчет инкрементного показателя «затраты-эффективность» для анализа «затраты-эффективность» или «затраты-полезность» (ICER) составил **-845 898,80 ₽**, в рамках ТППГ (Таблица 49).

В свою очередь ICER для медицинской организации составил **-103 483,12 ₽** (Таблица 50).

Таблица 49 – Расчет экономической эффективности в рамках ТПГГ

					а
	Затраты	21 363 470,00 Р	-	Р	
	Предотвращенные потери глаза	1 000		0	
		ICER КТ/1 пред.потеря глаза	21 363,47 Р		
	Затраты	89 035 374,00 Р	-	Р	б
	Предотвращенные потери глаза	920		0	
		ICER/1 пред.потеря глаза	96 777,58 Р		
Формулы					
ICER		ICER =(3а-3б)/(3а-3б)			
а,б - сравниваемые технологии					

Таблица 50 – Расчет экономической эффективности в рамках затрат медицинской организации

				а
Затраты		33 555 100,00 Р	- Р	
Предотвращенные потери глаза		1 000	0	
ICER КТ/1 пред.потеря глаза		33 555,10 Р		б
Затраты		136 118 217,10 Р	- Р	
Предотвращенные потери глаза		920	0	
ICER/1 пред.потеря глаза		147 954,58 Р		
Формулы				
ICER		ICER =(3а-3б)/(3а-3б)		
а,б - сравниваемые технологии				

Инфекция переднего отрезка

Технологические и клинические аспекты ведения пациентов с бактериальным кератитом включают в себя эпибульбарные инстилляции АБ в различных режимах дозирования, подключения к местной терапии мидриатиков и кортикостероидов (в зависимости от регресса клинической симптоматики, рисков перехода в кератоувеит), а также стационарного и хирургического лечения, в случаях прогрессирования патологического процесса, отягощенного риском перфорации роговицы.

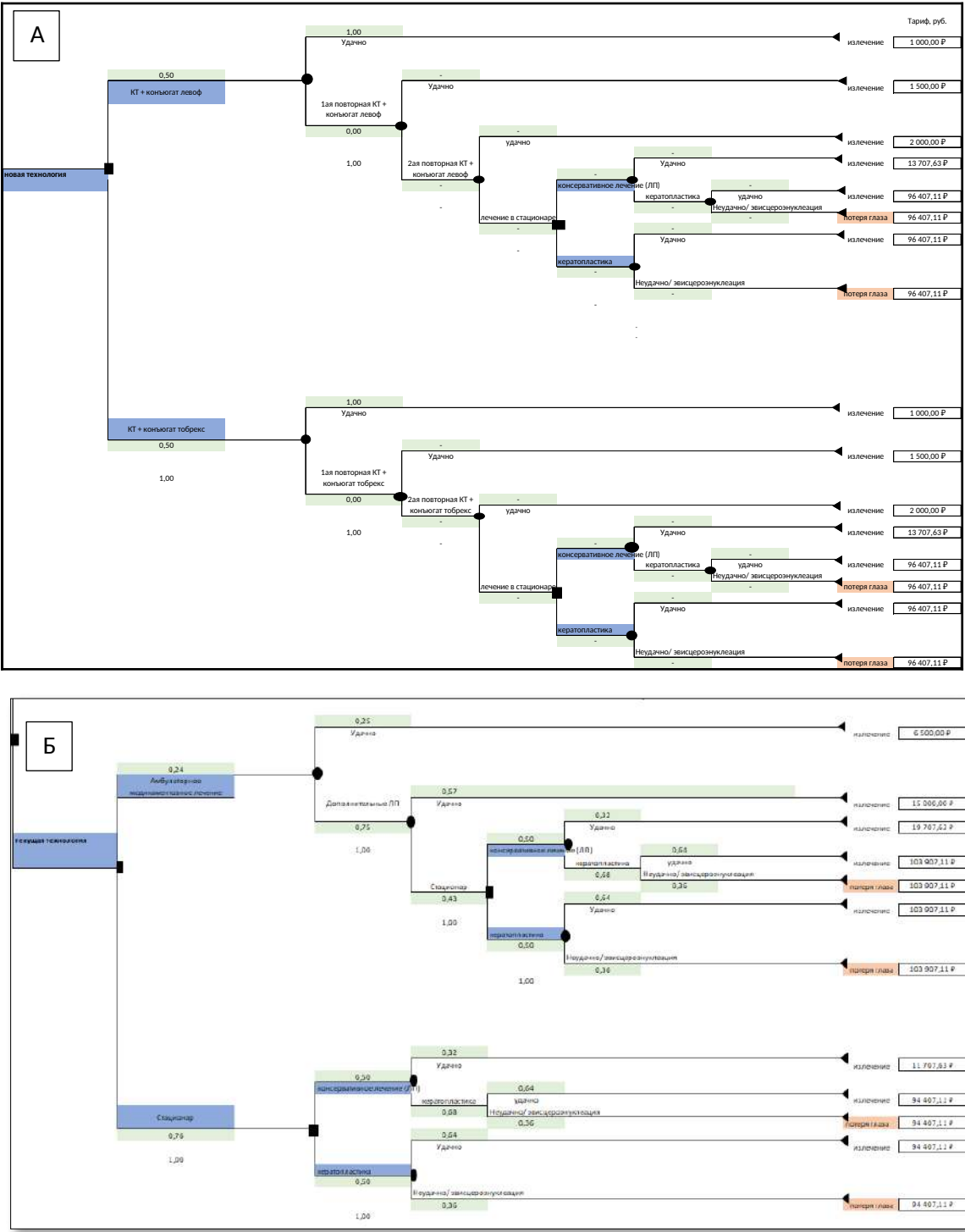
Результаты ретроспективного анализа клинической группы (n=90) с проявлениями БК демонстрируют фармакохирургические подходы, используемые в лечении анализируемой группы пациентов, с заложенной вероятностью развития событий при использовании разработанной технологии лечения (Таблица 51).

Таблица 51 – Процентная вероятность ретроспективной «стандартной» и моделируемой разработанной технологий лечения бактериального кератита

Вероятности	%
Разработанная технология	
КТ + конъюгат левофлоксацин	50,00%
КТ + конъюгат тобрекс	50,00%
вероятность успешной КТ + конъюгат левофлоксацин	100,00%
вероятность повтора процедуры КТ + конъюгат левофлоксацин	0,00%
вероятность успешной 1-й повторной КТ + конъюгат левофлоксацин	0,00%
вероятность повтора процедуры после 1ой повторной КТ + конъюгат левофлоксацин	0,00%
вероятность успешной 2-й КТ + конъюгат левофлоксацин	0,00%
вероятность неудачи 2-й повторной процедуры КТ + конъюгат левофлоксацин и переход на лечение в стационаре	0,00%
вероятность успешной КТ + конъюгат тобрекс	100,00%
вероятность повтора процедуры КТ + конъюгат тобрекс	0,00%
вероятность успешной 1-й повторной КТ + конъюгат тобрекс	0,00%
вероятность повтора процедуры после 1-й повторной КТ + конъюгат тобрекс	0,00%
вероятность успешной 2-й КТ + конъюгат тобрекс	0,00%
вероятность неудачи 2-й повторной процедуры КТ + переход на лечение в стационаре	0,00%
«Стандартная» терапия	
вероятность амбулаторного медикаментозного лечения	75,56%
вероятность стационарного лечения	24,44%
вероятность удачного амбулаторного лечения	25,00%
вероятность назначения дополнительных ЛП амбулаторно	75,00%
вероятность успешного дополнительного назначения ЛП амбулаторно	56,86%
вероятность перевода на стационарное лечение	43,14%
вероятность назначения медикаментозного лечения в стационаре	50,00%
вероятность кератопластики	50,00%
вероятность успешной медикаментозной терапии в стационаре	31,82%
вероятность неудачи МТ лечения и назначения кератопластики	68,18%
вероятность успешной кератопластики	63,64%
вероятность неудачи кератопластики и эвисцероэнуклеации/ потеря глаза	36,36%

На основании заложенной процентной вероятности сформировано древо решений с учетом тарифов ТПГГ (Рисунок 133) и затрат медицинской

организации на оказание медицинской помощи по данной нозологии, которое отображено на Рисунке 134.



А – разработанная (новая) технология лечения;

Б – «стандартная» технология лечения. Ретроспективный анализ

Рисунок 133 – Древо решений с учетом тарифов ТПГГ

эффективность» на 1000 пациентов в рамках ТПГГ составляет **1.000.000.00 Р**, при отсутствии рисков потери глаза как органа (Таблица 52).

Таблица 52 – Фармакоэкономический анализ проводимого лечения бактериальных кератитов посредством разработанной (новой) технологии в рамках ТПГГ

1000 Когорта пациентов			
	Вероятность пути	Ожидаемое кол-во пациентов	Ожидаемые затраты
		новая технология	
излечение	50,0%	500	500 000,00 Р
излечение	0,0%	0	- Р
излечение	0,0%	0	- Р
излечение	0,0%	0	- Р
излечение	0,0%	0	- Р
потеря глаза	0,0%	0	- Р
излечение	0,0%	0	- Р
потеря глаза	0,0%	0	- Р
излечение	50,0%	500	500 000,00 Р
излечение	0,0%	0	- Р
излечение	0,0%	0	- Р
излечение	0,0%	0	- Р
излечение	0,0%	0	- Р
потеря глаза	0,0%	0	- Р
излечение	0,0%	0	- Р
потеря глаза	0,0%	0	- Р
Потеря глаза совокупно		0	
Сумма	100,0%	1 000	1 000 000,00 Р
твращенные потери глаза		1 000	

Фармакоэкономический анализ проводимого лечения бактериальных кератитов посредством «стандартной» технологии методом «анализ затраты-эффективность» на 1000 пациентов в рамках ТПГГ составляет **68 184 217,84 Р**,

с учетом ретроспективных данных – число энуклеаций глазного яблока за период анализа данных (Таблица 53).

Таблица 53 – Фармако-экономический анализ проводимого лечения бактериальных кератитов посредством «стандартной» технологии в рамках ТПГГ

излечение	6,11%	61	61 111,11 Р
излечение	10,42%	104	156 372,55 Р
излечение	1,26%	13	166 174,43 Р
излечение	1,72%	17	1 654 043,55 Р
потеря глаза	0,98%	10	945 167,75 Р
излечение	2,52%	25	2 425 930,55 Р
потеря глаза	1,44%	14	1 386 246,03 Р
излечение	12,02%	120	1 407 280,78 Р
излечение	16,39%	164	15 474 443,65 Р
потеря глаза	9,37%	94	8 842 539,23 Р
излечение	24,04%	240	22 695 850,69 Р
потеря глаза	13,74%	137	12 969 057,54 Р
Потеря глаза совокупно		255	
Сумма	100,0%	1 000	68 184 217,84 Р
твращенные потери глаза		745	
сохраненные глаза:		255	
разница в затратах -		67 184 217,84 Р	

В свою очередь, фармакоэкономический анализ проводимого лечения бактериальных кератитов посредством **разработанной технологии** методом «анализ затраты-эффективность» на 1000 пациентов в рамках затрат медицинской организации составляет **6 757 500,00 Р**, без потери глаза как органа соответственно (Таблица 54).

Таблица 54 – Фармакоэкономический анализ проводимого лечения посредством разработанной технологии в рамках затрат медицинской организации

1000 Когорта пациентов			
	Вероятность пути	Ожидаемое кол-во пациентов	Ожидаемые затраты
новая технология			
излечение	50,0%	500	3 405 000,00 ₽
излечение	0,0%	0	- ₽
излечение	0,0%	0	- ₽
излечение	0,0%	0	- ₽
излечение	0,0%	0	- ₽
потеря глаза	0,0%	0	- ₽
излечение	0,0%	0	- ₽
потеря глаза	0,0%	0	- ₽
излечение	50,0%	500	3 352 500,00 ₽
излечение	0,0%	0	- ₽
излечение	0,0%	0	- ₽
излечение	0,0%	0	- ₽
излечение	0,0%	0	- ₽
потеря глаза	0,0%	0	- ₽
излечение	0,0%	0	- ₽
потеря глаза	0,0%	0	- ₽
Потеря глаза совокупно		0	
Сумма	100,0%	1 000	6 757 500,00 ₽
твращенные потери глаза		1 000	

Фармакоэкономический анализ проводимого лечения бактериальных кератитов посредством «стандартной» технологии – 70 508 237,45 ₽, с аналогичным числом энуклеаций (Таблица 55).

Таблица 55 – Фармакоэкономический анализ проводимого лечения бактериальных кератитов посредством «стандартной» технологии в рамках затрат медицинской организации

излечение	6,11%	61	397 222,22 Р
излечение	10,42%	104	1 563 725,49 Р
излечение	1,26%	13	247 955,48 Р
излечение	1,72%	17	1 782 720,02 Р
потеря глаза	0,98%	10	1 018 697,16 Р
излечение	2,52%	25	2 614 656,04 Р
потеря глаза	1,44%	14	1 494 089,16 Р
излечение	12,02%	120	1 407 280,78 Р
излечение	16,39%	164	15 474 443,65 Р
потеря глаза	9,37%	94	8 842 539,23 Р
излечение	24,04%	240	22 695 850,69 Р
потеря глаза	13,74%	137	12 969 057,54 Р
Потеря глаза совокупно		255	
Сумма	100,0%	1 000	70 508 237,45 Р
твращенные потери глаза		745	

На основании полученных данных в ходе фармакоэкономического анализа разработанной и «стандартной» технологий лечения бактериальных кератитов, расчет инкрементного показателя «затраты-эффективность» для анализа «затраты-эффективность» или «затраты-полезность» (ICER) составил **-263 239,74 Р**, в рамках ТПГГ (Таблица 56).

Таблица 56 – Расчет экономической эффективности в рамках ТПГГ

					а
	Затраты	1 000 000,00 ₽	-	₽	
	Предотвращенные потери глаза	1 000		0	
		ICER КТ/1 пред.потеря глаза	1 000,00 ₽		
	Затраты	68 184 217,84 ₽	-	₽	б
	Предотвращенные потери глаза	745		0	
		ICER/1 пред.потеря глаза	91 549,56 ₽		
Формулы					
ICER			ICER =(3а-3б)/(3а-3б)		
а,б - сравниваемые технологии					

ICER в рамках затрат медицинской организации составил **-249 786,75 ₽** (Таблица 57).

Таблица 57 – Расчет экономической эффективности в рамках затрат медицинской организации

					а
	Затраты	6 757 500,00 ₽	-	₽	
	Предотвращенные потери глаза	1 000		0	
		ICER КТ/1 пред.потеря глаза	6 757,50 ₽		б
	Затраты	70 508 237,45 ₽	-	₽	
	Предотвращенные потери глаза	745		0	
		ICER/1 пред.потеря глаза	94 669,97 ₽		
Формулы					
ICER			ICER =(3а-3б)/(3а-3б)		
а,б - сравниваемые технологии					

Таким образом, в результате проведенного фармакоэкономического анализа методом «затраты-эффективность» по обоснованию возможности клинического применения разработанной технологии лечения антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза установлено, что анализ разработанной и «стандартной» технологий лечения *внутриглазной инфекции* посредством расчета инкрементного показателя «затраты-эффективность» или «затраты-полезность» (ICER) составил **-845 898,80 ₽**, в рамках территориальной программы государственных гарантий и демонстрирует снижение затрат и рост эффективности в пользу разработанной технологии лечения. Экономия средств при этом составляет **67 671 904,00 ₽**.

Анализ разработанной и «стандартной» технологий лечения *внутриглазной инфекции* посредством расчета инкрементного показателя «затраты-эффективность» или «затраты-полезность» (ICER) составил **-103 483,12 Р**, в рамках затрат медицинской организации и аналогичным образом демонстрирует снижение затрат и рост эффективности в пользу разработанной технологии лечения. Экономия средств при этом составляет **132 762 707,48 Р**.

На основании полученных данных в ходе фармакоэкономического анализа разработанной и «стандартной» технологий лечения *бактериального кератита*, расчет инкрементного показателя «затраты-эффективность» или «затраты-полезность» (ICER) составил **-263 239,74 Р** в рамках ТПГГ и демонстрирует снижение затрат и рост эффективности в пользу разработанной технологии лечения. Экономия средств при этом составляет **67 184 217,84 Р**.

На основании полученных данных в ходе фармакоэкономического анализа разработанной и «стандартной» технологий лечения *бактериального кератита*, расчет инкрементного показателя «затраты-эффективность» или «затраты-полезность» (ICER) составил **-249 786,75 Р** в рамках затрат медицинской организации и демонстрирует снижение затрат и рост эффективности в пользу разработанной технологии лечения. Экономия средств при этом составляет **63 750 737,45 Р**. Разработанная технология лечения инфекционных заболеваний глаза с помощью конъюгатов на основе наночастиц эффективна и экономически оправдана.

В результате многоуровневой проработки требований для создания лекарственного препарата на основе квантовых точек, а также определения его места в системе фармакотерапии антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза с проведением фармакоэкономического анализа были разработаны требования для создания лекарственного препарата с использованием квантовых точек и конъюгатов на их основе для применения в офтальмологической практике; разработана система фармакотерапии антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза с учетом места в

ней разработанной технологии лечения и проведен фармакоэкономический анализ разработанной технологии лечения, для оценки затрат и прогнозирования эффективности предложенного подхода к терапии антибиотикорезистентных инфекций глаза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день проблема эффективного лечения инфекционных заболеваний глаза приобретает особую актуальность.

С одной стороны, развитие медицины в целом, предъявляемые к асептике и антисептике современные требования, дополненные микроинвазивными хирургическими технологиями, обуславливают полную инфекционную безопасность пациента; с другой стороны, массовость распространения хирургической офтальмологической помощи, смещение ее в амбулаторное звено, приводит к поддержанию роста послеоперационных инфекционных заболеваний глаза на высоком уровне в абсолютных цифрах.

Послеоперационная инфекция, возникающая в условиях стационара, может быть, и, как правило, опосредована штаммами с МЛУ, что накладывает особый отпечаток на тактику ведения таких пациентов. Во многих случаях, стандартные (рутинные) АБ могут оказаться малоэффективными, что приводит к длительному, изнурительному для врача и пациента алгоритму коррекции терапии, повышая риски получения негативных функциональных и анатомических результатов.

Более того, современный ритм жизни, доступность АБ в аптечной сети, массовое применение средств контактной коррекции, актуализирует вторую проблему – ассоциированные с ношением мягких контактных линз инфекционно-воспалительные заболевания переднего отрезка глаза.

Особенность осложнённого течения этой группы заболеваний соотносится с низкой выявляемостью, быстрым прогрессированием, сложностью терапевтического ведения, высоким риском осложнений, способных окончиться анатомической потерей глазного яблока.

Общеизвестно, что современные достижения в области биохимии, микробиологии, фармацевтике и многих комплексных фундаментальных наук позволяют эффективно продвигаться в лечении инфекционных заболеваний

глаза, однако проблема антибиотикорезистентности, набирающая обороты в последняя время, способна нивелировать достигнутый в прошлом успех.

К сожалению, инфекционные заболевания переднего и заднего отрезков глаза, вызванные штаммами с лекарственной устойчивостью (антибиотикорезистентностью), имеют ряд клинико-фармакологических особенностей, которые чрезвычайно осложняют процесс лечения пациента. К ним относятся: скорость развития клинического процесса, отсутствие регресса клинических симптомов, несмотря на проведение интенсивной медикаментозной терапии, длительный период реабилитации и крайне низкие функциональные и анатомические результаты, получаемые в исходе заболевания.

Анализ совокупных данных, описанных в обзоре литературы диссертационного исследования, сформировал интерес исследователя в отношении поиска новых эффективных технологических подходов, способных «разорвать» порочный круг кризиса антибиотикорезистентности и разработать новую эффективную и безопасную технологию лечения антибиотикорезистентных инфекций глаза.

В основу технологии легли популяризированные в последнее время искусственные флуорофоры, называемые в научной литературе квантовыми точками (quantum dots). Представленные в диссертационной работе КТ представляют собой нанометровые (2-10 нм) объекты сферической формы, состоящие из металлов группы полупроводников таблицы Менделеева (III-V группа) и имеющие различное количество оболочек (ядро, покрытие и др.). Как было описано ранее, диаметр ядра, количество оболочек (одна, две, три) на поверхности КТ, характер пассивации (покрытие на границе раздела ядра и оболочки для устранения электронных ловушек, как правило, за счет материала с большей шириной энергии запрещенной зоны), функционализации (специфического покрытия для возможности связывания с биологически активными молекулами, белками, пептидами, нуклеиновыми

кислотами – так называемого биоконъюгирования) позволяют использовать их в различных областях науки и техники.

Особенностью КТ является свойство их как нанообъектов не подчиняться стандартным физическим законам, а функционировать исключительно в поле квантовой физики, обладая тем самым совокупностью свойств и особенностей, позволяющих эффективно применять их в офтальмологической практике.

Одним из многочисленных свойств КТ, лежащих в основе предпосылок их применения в качестве антиинфекционных агентов в офтальмологической практике, является способность вступать в химические реакции с водой и кислородом, посредством донорства неспаренных электронов, находящихся на их внешнем энергетическом уровне. Данная особенность позволяет эффективно образовывать АФК и перекисные соединения в управляемом потоке воздушной и жидкой фазы, которые способны оказывать пагубное воздействие на возбудителей инфекции.

Второе свойство КТ, достойное описания в главе заключения, основано на гиперпроницаемости нанообъектов во внутриклеточные структуры за счет сверхмалых размеров и различных типов физико-химических связей, основанных на законах термодинамики, ионных взаимодействиях, силах Ван-Дер-Ваальса и многих других, лежащих в основе фундаментальных законов квантовой физики.

Исключительной особенностью КТ также является их управляемое окислительное взаимодействие с объектами живой природы посредством световой активации. Именно оно лежит в основе донорства электронных пар и химической активности нанообъектов, что может относить КТ к объектам фотоиндуцированной терапии инфекционных заболеваний.

Исходя из вышесказанного, у автора диссертации родилась идея использования КТ в двух направлениях, одно из них – это использование КТ в чистом виде путем фотовозбуждения с образованием активных форм кислорода, губительно действующих на возбудителя, второе – комбинация АБ

и фотоактивированных КТ для увеличения потенциала активности используемых химиотерапевтических агентов.

Предполагаемая теория, основанная на механизме антиинфекционной активности КТ, заключается в следующем: фотосенсибилизированная (чрезвычайно реакционно активная) источником света определенной длины волны КТ имеет на своей поверхности неспаренные электроны, которые выступают в качестве донора для молекулярного кислорода, трансформируя его в супероксидный радикал, который, в свою очередь, обладает высокоспецифичным узконаправленным действием на бактериальные внутриклеточные кластеры железа и серы, разрушая нормальную внутриклеточную окислительно-восстановительную среду, необходимую для нормального функционирования патогенного микроорганизма. При этом доставка КТ непосредственно в бактериальную клетку осуществляется посредством вышеописанных свойств ее гиперпроницаемости.

Все вышесказанное определило цель диссертационного исследования – Улучшение результатов лечения лекарственно резистентных бактериальных инфекций глаза с помощью конъюгатов на основе наночастиц (квантовых точек).

Задачи, поставленные перед исследователем, состояли в следующем: на основании ретроспективного анализа клинико-функциональных и анатомических результатов лечения бактериальных инфекций глаза доказать их недостаточную эффективность; на основании физико-химических, биологических и фармакологических исследований обосновать возможность применения квантовых точек и конъюгатов на их основе для лечения антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза; на основании бактериологических методов исследования *in vitro* доказать антибактериальную активность квантовых точек и конъюгатов на их основе; в эксперименте *in vivo* доказать клиническую эффективность лечения антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза с помощью квантовых точек и конъюгатов на их основе; 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; 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; разработать требования для создания лекарственного препарата с использованием квантовых точек и конъюгатов на их основе для применения в офтальмологической практике; на основании существующих терапевтических моделей определить место разработанной технологии в системе фармакотерапии антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза; на основании фармакоэкономического анализа методом «затраты-эффективность» обосновать возможность клинического применения разработанной технологии лечения антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза.

Реализация данной цели и поставленных задач была невозможна без проведения комплекса ретроспективных, фундаментальных, клинико-лабораторных, цитогистоморфологических и фармакоэкономических исследований.

Для подтверждения данных об актуальности темы диссертационного исследования была проанализирована отечественная и зарубежная литература, а также проведен ретроспективный анализ результатов лечения бактериальных инфекций глаза, в основе которого лежала работа с медицинской документацией с последующей ее статистической обработкой.

Фундаментальная часть работы была основана на проведении физико-химических, биологических и фармакологических исследований с задействованием медицинского и специализированного оборудования, в задачи которой входило обоснование возможности использования квантовых

точек и конъюгатов на их основе в лечении антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза.

Экспериментальная часть диссертации была акцентирована на проведении лабораторных методов исследования, в частности метода диско-диффузионного анализа, в аспекте доказательства антибактериальной активности квантовых точек и конъюгатов на их основе, а также проведения экспериментов с участием лабораторных животных для моделирования воспалительного процесса на переднем и заднем отрезках глазного яблока с последующей оценкой эффективности разработанной технологии лечения антибиотикорезистентной бактериальной инфекции глаза.

После доказательства лабораторной и экспериментальной эффективности разработанной технологии, было необходимо провести исследования по изучению безопасности КТ и конъюгатов на их основе на клеточном, тканевом, функциональном и анатомическом уровнях с непосредственным участием лабораторных животных, а также клеточных технологий.

На завершающем этапе диссертации были разработаны требования для создания лекарственного препарата, проведен фармакоэкономический анализ, а также определено место разработанной технологии в системе фармакотерапии антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза.

Ретроспективный анализ клинико-функциональных результатов лечения бактериальных инфекций глаза (1837 случаев кератитов и 100 случаев острых послеоперационных эндофтальмитов) проведен в АО «Екатеринбургский центр МНТК «Микрохирургия глаза», пролеченных в периоды с 2017 (кератиты) и с 2002 (эндофтальмиты) по 2023 годы. В ходе обработки и обобщения полученных данных было установлено, что частота встречаемости АБ-резистентных штаммов составляет 2,94% для бактериальных инфекций переднего отрезка глаза и 28,7% для инфекций, вызывающих бактериальное поражение 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, установлено, что функциональные исходы лечения при воспалительных заболеваниях заднего отрезка глаза, вызванных штаммами с антибиотикорезистентностью, характеризуются регрессом зрительных функций на завершающем этапе лечения и отсутствием функциональной прибавки в исходе воспалительных заболеваний переднего отрезка глаза ($p \leq 0,05$). На основании этих данных автором были сделаны выводы, о необходимости разработки новой технологии лечения, позволяющей повысить функциональные и анатомические результаты лечения инфекционных заболеваний глаза бактериальной этиологии.

Данные, полученные в ходе ретроспективного анализа, вызывают особый интерес, в силу того, что несколько превышают данные описанные в работах [144, 115], где указывается частота встречаемости штаммов с МЛУ с районе 30-35% с структуре G^+ и G^- микрофлоры. Тем не менее, общая тенденция, указывающая на присутствие антибиотикорезистентных штаммов в структуре глазных инфекций, подтверждает свою актуальность.

Целью фундаментальных исследований явилось обоснование возможности применения созданных и адаптированных для офтальмологической практики полупроводниковых квантовых точек и конъюгатов на их основе в лечении антибиотикорезистентных бактериальных инфекциях глаза, а также исследование их базовых антиинфекционных свойств. Для достижения поставленной цели было необходимо: сформировать техническое задание и разработать адаптированные квантовые точки для офтальмологического использования; провести исследование антиинфекционной активности квантовых точек, заключающееся в их способности к генерации активных форм кислорода при возбуждении источниками освещения с заданной длиной волны; изучить особенности физического взаимодействия квантовых точек с бактериальной клеткой посредством электронной микроскопии, а также исследовать особенности динамического изменения структуры бактериальной клетки при

проникновении в нее квантовых точек; создать конъюгаты на основе квантовых точек и антибиотиков, провести исследование их физико-химического взаимодействия: ингибирование, инактивация, синергизм, нейтральные взаимоотношения; изучить влияние внешних факторов (температурных изменений), биологического окружения на активность квантовых точек, с целью прогнозирования их функционирования в условиях гомеостаза организма; исследовать возможность стерилизации квантовых точек для последующего офтальмологического использования.

На основании результатов фундаментального этапа диссертационного исследования были получены данные, которые легли в основу следующих этапов диссертационной работы. На основании поставленного технического задания были разработаны три типа квантовых точек – CdTe/Cd 710 МРА, InP/ZnSe/ZnS 650 МРА, Ag(10%):InP/ZnS МРА, адаптированных для офтальмологической практики, в основе которых заложена улучшенная химическая стабильность и увеличенный период полураспада молекулы за счет обработки поверхности 3-меркаптопропионовой кислотой и введения в качестве противоиона тетраметиламмония; КТ имеют узкую ширину пиков на полувысоте для одновременной идентификации множества флуоресцентных сигналов во время проведения спектрофотометрических исследований с лекарственными соединениями; спектры поглощения всех типов КТ варьируют в диапазоне от 350 до 750 нм, что дает возможность их возбуждения и возможность генерации АФК в видимой области спектра – дневного света; спектры флуоресценции всех типов КТ смещены в инфракрасную область, что минимизирует риск токсического повреждения нейроретинальных структур. Форма дисперсии КТ в водной среде позволяет производить активную работу по их титрованию.

В исследованиях, посвященных способности различных типов КТ к образованию АФК, впервые доказано, что все три типа исследуемых КТ (Ag(10%):InP/ZnS, CdTe/Cd, InP/ZnSe/ZnS) способны к выработке АФК на основании Ox и Red реакций с использованием CytC и ДГРМ; генерация АФК

активно проходит на сверхмалых масс. концентрациях, достигающих предела в 1000-кратных разведениях в видимой области спектра; способность к выработке АФК регламентирована состоянием рН, что обусловлено изменением окислительно-восстановительного потенциала исследуемых объектов, однако его изменения в области крайних диапазонов не существенны; генерация АФК-окислителей растет в ряду: $\text{Ag}(10\%):\text{InP}/\text{ZnS} < \text{CdTe}/\text{Cd} < \text{InP}/\text{ZnSe}/\text{ZnS}$. Генерация восстанавливающих форм АФК растет в ряду: $\text{CdTe}/\text{Cd} < \text{Ag}(10\%):\text{InP}/\text{ZnS} \ll \text{InP}/\text{ZnSe}/\text{ZnS}$; 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.

На основании результатов исследования физического взаимодействия и фармакокинетики КТ с бактериальной клеткой методами сканирующей (растровой – РЭМ) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) сделано заключение, что полученные данные по фармакокинетике процесса сходны. 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 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. На основании проведенного этапа исследования можно сделать вывод о том, что КТ обладают потенциалом к проникновению непосредственно во внутриклеточное пространство через сформированные мембранные каналы. Механизмы, происходящие в клетке после проникновения КТ, сопровождаются ее полным разрушением, предположительно физико-

химической основой которых являются процессы образования АФК посредством химической активности КТ.

На основании результатов синтеза и исследования конъюгатов на основе КТ и АБ (КТ/Ванкомицин, КТ/Цефтазидим, КТ/Левифлоксацин, КТ/Тобрамицин), используемых в офтальмологической практике для лечения воспалительных заболеваний переднего и заднего отрезка глазного яблока, методами регистрации флуоресценции и оптической плотности можно сделать заключение о том, что все исследуемые типы КТ не формируют химического и физического взаимодействия с АБ вне зависимости от концентрации КТ, типа и концентрации АБ. Соответственно в клинической практике имеет место двойной механизм воздействия на патогенную микрофлору, который обусловлен процессом образования АФК посредством КТ и механизмом действия АБ.

Результаты исследования, полученные в ходе изучения влияния температурных изменений на физическую активность КТ (n=20) методами флуоресцентного анализа, продемонстрировали отсутствие смещения спектров возбуждения и эмиссии исследуемых КТ при варьировании температуры, что указывает на возможность стабильного состояния нанобиокомплекса в условиях изменения температуры при контакте с биологическими средами человеческого организма. Результаты исследования влияния биологического окружения на активность КТ (n=20) методами флуоресцентного анализа продемонстрировали его способность оказывать влияние на оптические и люминесцентные свойства КТ, а, следовательно, на процессы генерации АФК. В клинической практике эпibuльбарные инстилляции КТ не будут подвержены смещению спектров возбуждения и эмиссии, однако интравитреальное введение конъюгатов может сочетаться с удалением патологического субстрата из витреальной полости для минимизации рисков воздействия биологических и химических субстратов на свойства КТ.

На основании результатов исследования, посвященных возможности стерилизации КТ с помощью трековых мембран ($n=20$), с последующим бактериологическим анализом, было установлено, что техническое прохождение КТ через них осуществимо. Диаметр пор трековых мембран, равный 50 нм, гарантированно задерживает потенциальных возбудителей глазной бактериальной инфекции, в силу среднего размера бактериальной клетки 200-500 мкм. Отсутствие роста патогенной флоры в контрольной группе ($n=20$, без трековых мембран), вероятнее всего обусловлено собственными антиинфекционными свойствами КТ, однако это требует дальнейшего изучения.

Анализ массива данных, полученных в ходе фундаментального этапа работы, попытка его осмысления, понимание необходимости их сравнения с современными данными литературами говорит о следующем. В литературе имеются данные об антиинфекционных свойствах полупроводниковых КТ [114, 253, 40, 87, 70, 71], ограниченные перспективой их использования в общей клинической практике, при отсутствии описания доказанных механизмов их взаимодействия с микрофлорой. В литературе нет данных о простых и доступных методиках детектирования АФК, при том, что описание этих явлений обосновывается теоретическими предпосылками. Особенности взаимодействия КТ с бактериальной клеткой также отсутствуют в литературе. В доступной литературе не обнаружено данных по созданию конъюгатов с КТ и антибиотиками и анализа их взаимодействия. Влияние биологического окружения, температурных характеристик, а также способов возможной стерилизации также не было найдено автором диссертации в доступных источниках. Самым важным аспектом является то, что в информационных источниках отсутствует экстраполяция перспектив применения КТ и конъюгатов на их основе в офтальмологической практике, что придает данному этапу диссертационной работы особую важность.

Клинико-лабораторные и цитогистоморфологические исследования эффективности и безопасности применения квантовых точек и конъюгатов на

их основе проводились в нескольких направлениях: с помощью бактериологических методов исследования изучалось влияние квантовых точек и конъюгатов на их основе на возбудителей бактериальных инфекций глаза, в том числе антибиотикорезистентных; экспериментально доказывалась антибактериальная активность квантовых точек и конъюгатов на их основе в отношении антибиотикорезистентной G^+ и G^- микрофлоры путем проведения моделирования инфекционного воспалительного процесса на переднем и заднем отрезках глаза у лабораторных животных; изучались клеточная, тканевая, анатомическая и функциональная безопасность квантовых точек и конъюгатов на их основе с помощью клинических, функциональных, гистоморфологических и цитологических методов исследования на лабораторных животных.

В ходе анализа антибактериальной активности квантовых точек и конъюгатов на их основе ($n=30$), методом диско-диффузионного анализа в различных концентрациях (1:10, 1:100, 1:1000) при фотовозбуждении и без него, в отношении антибиотикорезистентных возбудителей инфекционных офтальмологических заболеваний *in vitro* было установлено, 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 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 ($p \leq 0,05$). С клинической точки зрения госпитальные штаммы являются микроорганизмами с наиболее выраженными факторами защиты, агрессии и инвазии. Учитывая эту особенность, конъюгаты на основе КТ проявляют более выраженную активность в отношении потенциально резистентной к

проводимой антибиотикотерапии микрофлоре по сравнению с традиционными антимикробными средствами.

Изменение концентрации КТ в пределах от 1 до 0,01% значимо не влияет на антиинфекционную активность конъюгатов в отношении амбулаторных и госпитальных штаммов микроорганизмов. Это может существенно влиять на минимизацию рисков токсического повреждения интраокулярных структур, за исключением синегнойной инфекции ($p \leq 0,05$). Источник возбуждения (свет видимой области спектра) значимо не влияет на повышение активности конъюгатов со всеми типами КТ, что вероятнее всего обусловлено их реакциогенностью и гиперчувствительностью к возбуждаемым световым волнам ($p \leq 0,05$). Наибольшую эффективность в отношении увеличения ЗЗР значимо продемонстрировали КТ типа $\text{Ag}(10\%):\text{InP}/\text{ZnS}$ в отношении амбулаторных и госпитальных штаммов микроорганизмов, что вероятнее всего обусловлено дополнительным ингибирующим воздействием серебра, входящим в структуру КТ ($p \leq 0,05$).

Прицельное исследование активности КТ в отношении мультирезистентной синегнойной инфекции продемонстрировало значимое увеличение ЗЗР, в среднем на $9 \pm 1,5$ мм, что может являться ключевой точкой приложения КТ в отношении потенциального лечения резистентной глазной инфекции ($p \leq 0,05$).

Вне зависимости от источника возбуждения и концентрации раствора КТ, 6% исследуемых амбулаторных штаммов микроорганизмов имеют ЗЗР очень высокой эффективности (свыше 5 мм), 69% – высокой эффективности (2-5 мм), 9% – умеренной эффективности (до 2 мм), у 16% выявлено отсутствие увеличения ЗЗР. Вне зависимости от источника возбуждения и концентрации раствора КТ, 13% исследуемых госпитальных штаммов микроорганизмов имеют ЗЗР очень высокой эффективности (свыше 5 мм), 77% – высокой эффективности (2-5 мм), 6% – 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.

В доступной литературе имеются данные об активности КТ в отношении различных микроорганизмов, что не является новаторской информацией. Однако в литературе отсутствуют данные об активности любых видов конъюгатов на основе наночастиц и антибиотиков, сравнении их активности в отношении амбулаторных и внутрибольничных штаммов, анализ влияния источников возбуждения КТ и тем более в отношении потенциальных возбудителей глазных инфекций. В этой связи данный раздел диссертации приобретает особую ценность.

В свою очередь, в ходе изучения доклинической эффективности разработанной технологии лечения инфекционного поражения глаза с помощью квантовых точек и конъюгатов на их основе (n=87 Новозеландских кроликов), вызванного антибиотикорезистентной Гр⁻ и Гр⁺ микрофлорой, на лабораторных животных была доказана эффективность лечения экспериментального кератита (n=20) посредством применения конъюгата InP/ZnSe/ZnS 650 в концентрации 0,01% в сочетании с Тобрамицином в отношении резистентной к Тобрамицину синегнойной инфекции роговицы, продемонстрировав увеличение эффективности лечения на 120-130% в сравнении с эпibuльбарными инстилляциями Тобрамицина. Доказана эффективность лечения экспериментального кератита (n=20) посредством применения конъюгата CdTe/Cd МРА 710 в концентрации 0,01% в сочетании с Левофлоксацином в отношении резистентной к Левофлоксацину стафилококковой инфекции роговицы, продемонстрировав увеличение эффективности лечения на 110-120% в сравнении с эпibuльбарными инстилляциями Левофлоксацина.

Доказана эффективность лечения экспериментального антибиотикорезистентного эндофтальмита, вызванного синегнойной инфекцией (n=27), с помощью квантовых точек Ag(10%):InP/ZnS МРА 0,1 мл в нативной 10%, 0,1% и 0,01% концентрациях, продемонстрировав увеличение

эффективности лечения на 85-90% в сравнении интравитреальной инъекцией Цефтазидима. Кроме того, доказана эффективность применения конъюгата на основе квантовых точек Ag(10%):InP/ZnS МРА 0,05 мл в нативной 10%, 0,1% и 0,01% концентрациях, в сочетании с 2,25 мг/0,05 мл Цефтазидима для лечения экспериментального антибиотикорезистентного эндофтальмита, вызванного синегнойной инфекцией. Продemonстрировано увеличение эффективности лечения на 100% в сравнении интравитреальной инъекцией Цефтазидима. Доказана эффективность лечения экспериментального антибиотикорезистентного эндофтальмита, вызванного резистентной к Ванкомицину стафилококковой инфекцией (n=20), с помощью конъюгата на основе 1 мг/0,05 мл Ванкомицина в сочетании с 0,01%/0,05 мл раствором КТ InP/ZnSe/ZnS 650, продемонстрировав увеличение эффективности лечения на 120-130% в сравнении интравитреальной инъекцией Ванкомицина. Полученные результаты демонстрируют эффективность разработанной технологии лечения антибиотикорезистентной инфекции переднего и заднего отрезков глазного яблока в сравнении со стандартными алгоритмами терапии в 2,6 раза ($p \leq 0,05$).

Исследования по моделированию патологического процесса на переднем отрезке глаза и витреальной полости *in vivo*, с использованием КТ и конъюгатов на их основе в различных концентрациях в сочетании с актуальными АБ в отношении штаммов с МЛУ(!) не найдены в доступных информационных источниках. Более того, в литературе отсутствуют данные по проведению подобных экспериментов с применением КТ в принципе, что указывает на особую важность данного раздела диссертации.

В ходе исследования доклинической (анатомической и функциональной) безопасности применения квантовых точек и конъюгатов на их основе (интравитреальное введение, электрофизиологические исследования у 48 Новозеландских кроликов) в разработанной технологии лечения антибиотикорезистентных инфекций глаза было установлено, что применение 10% раствора КТ CdTe/Cd МРА 710 в нативном состоянии и их

конъюгатов с АБ выявило признаки 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 диффузии раствора. Данные подтверждаются 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 не привело к существенным клиническим отклонениям от нормы при динамическом наблюдении, однако было выявлено значительное снижение амплитуды а- и b-волн, с увеличением латентности а-волны палочкового ответа. Снижение амплитуды обоих компонентов зарегистрировано во время максимального и колбочкового отклика. На основании этого можно сделать заключение, что при интравитреальном введении вышеописанные концентрации КТ CdTe/Cd МРА 710 (10% и 0,1%) приводят к частичному клиническому и функциональному нарушению зрительного анализатора.

Раствор 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 и могут быть рекомендованы в качестве субстрата для интравитреального и эпibuльбарного введения.

Результаты исследований КТ InP/ZnSe/ZnS 650 и КТ Ag(10%):InP/ZnS МРА (дополнительно функционализированные серебром), не выявили функциональных и анатомических нарушений во всех исследуемых концентрациях, за исключением группы КТ InP/ZnSe/ZnS 650 10% масс., при которых признаки токсического повреждения структур переднего отрезка проявлялись только в виде полнокровия сосудов радужной оболочки. Других клинических проявлений и нарушений функционального состояния глаз 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 повреждения интраокулярных структур.

Анализ данных, полученных в ходе решения данной задачи, и попытка поиска доступной информации в литературных источниках не увенчались успехом и указывают на то, что возможно, данные исследования проводятся впервые.

В свою очередь, в ходе изучения клеточной и тканевой безопасности (интравитреальное введение с гистоморфологическим исследованием энуклеированных глазных яблок (n=27), анализ острой и хронической цитотоксичности на клетках ЛЭЧ, определение метаболической активности клеток) применения квантовых точек и конъюгатов на их основе в разработанной технологии лечения антибиотикорезистентных инфекций глаза, 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, что демонстрирует безопасность их интраокулярного введения.

Аналогичным образом, практическое 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 2,25 мг/0,05 мл Цефтазидима на зрительный анализатор, что также демонстрирует возможность интраокулярной доставки исследуемых конъюгатов.

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 можно объяснить наименьшей антиинфекционной активностью нативного Цефтазидима в монотерапии в отношении синегнойной инфекции. На основании полученных данных можно сделать вывод о высокой антиинфекционной активности исследуемых КТ в отношении синегнойной инфекции в различных концентрациях в чистом виде и в составе конъюгатов, по данным гистоморфологического исследования.

При изучении токсического действия тестируемых препаратов на монослое ЛЭЧ-4(81) показано, что при инкубации культуры с исследуемыми тремя типами КТ в течение 48 часов обладают слабым цитопатическим действием в концентрации 1%-0,01%, при разведении 0,001% оно у всех КТ отсутствует. Однако квантовые точки Ag (10%) InP/ZnS MPA 710 обладают наименьшим токсическим действием на монослой культуры клеток и проявляют лишь в концентрации 1%-0,1%. МТТ-тест показал, что концентрация 0,001% не оказывает выраженного цитотоксического действия у всех трех типов исследуемых КТ. Концентрация 0,01% является умеренно токсичной для КТ Ag (10%) InP/ZnS MPA 710, InP/ZnSe/ZnS 650 MPA и минимально токсичной для КТ CdTe/Cd MPA 710.

Попытка поиска доступной информации в литературных источниках по данному этапу диссертационного исследования привела к негативным результатам, вероятнее всего в силу того, что офтальмологические исследования по клеточной, тканевой, функциональной и анатомической безопасности КТ и конъюгатов на их основе в офтальмологической отрасли еще не проводились.

В завершении исследования были разработаны требования для создания лекарственного препарата на основе квантовых точек, а также определено его место в системе фармакотерапии антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза с проведением фармакоэкономического анализа. Для достижения поставленной цели было необходимо: разработать требования для создания лекарственного препарата с использованием квантовых точек и

конъюгатов на их основе для применения в офтальмологической практике; разработать систему фармакотерапии антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза с учетом места в ней разработанной новой технологии лечения; провести фармакоэкономический анализ разработанной технологии лечения, для оценки затрат и прогнозирования эффективности предложенного подхода к терапии антибиотикорезистентных инфекций глаза.

В ходе разработки требований для создания лекарственного препарата с использованием квантовых точек и конъюгатов на их основе для применения в офтальмологической практике было установлено, что проведенный комплекс экспериментов позволяет утверждать, что разработанный лекарственный препарат должен отвечать и отвечает следующим характеристикам: ориентированность на офтальмопатологию; эффективность; безопасность; простота изготовления; простота использования; экономическая обоснованность.

Данные исследования проводились впервые и отсутствуют в литературных источниках.

В свою очередь, в результате разработки системы фармакотерапии антибиотикорезистентных бактериальных инфекций глаза на основании новой технологии лечения было установлено, что разработанные и обоснованные методы соответствуют современным представлениям о стратегиях лечения инфекционных заболеваний, в основе которых лежит комплексный подход, основанный на клинических проявлениях заболевания, динамики обратного развития симптомов, результатах бактериологического посева, уровне ответа на стартовую антиинфекционную терапию.

В ходе проведенного фармакоэкономического анализа разработанной технологии лечения бактериальной антибиотикорезистентной инфекции глаза было установлено, что анализ разработанной и «стандартной» технологий лечения внутриглазной инфекции посредством расчета инкрементного показателя «затраты-эффективность» или «затраты-полезность» (ICER) составил -845 898,80 ₽ в рамках территориальной программы

государственных гарантий и демонстрирует снижение затрат и рост эффективности в пользу разработанной технологии лечения. Экономия средств при этом составляет 67 671 904,00 Р.

Анализ разработанной и «стандартной» технологий лечения внутриглазной инфекции посредством расчета инкрементного показателя «затраты-эффективность» или «затраты-полезность» (ICER) составил -103 483,12 Р в рамках затрат медицинской организации и аналогичным образом демонстрирует снижение затрат и рост эффективности в пользу разработанной технологии лечения. Экономия средств при этом составляет 132 762 707,48 Р.

На основании полученных данных в ходе фармакоэкономического анализа разработанной и «стандартной» технологий лечения бактериального кератита, расчет инкрементного показателя «затраты-эффективность» или «затраты-полезность» (ICER) составил -263 239,74 Р в рамках ТППГ и демонстрирует снижение затрат и рост эффективности в пользу «разработанной» технологии лечения. Экономия средств при этом составляет 67 184 217,84 Р.

На основании полученных данных в ходе фармакоэкономического анализа «разработанной» и «стандартной» технологий лечения бактериального кератита, расчет инкрементного показателя «затраты-эффективность» или «затраты-полезность» (ICER) составил -249 786,75 Р в рамках затрат медицинской организации и демонстрирует снижение затрат и рост эффективности в пользу разработанной технологии лечения. Экономия средств при этом составляет 63 750 737,45 Р.

На основании проведенного моделирования и фармакоэкономических расчетов можно сделать заключение, что разработанная технология лечения инфекционных заболеваний глаза с помощью конъюгатов на основе наночастиц более эффективна и экономически оправдана. Подобные исследования не проводились и не отражены в литературных источниках.

Таким образом, результаты полученные в ходе проведенного диссертационного исследования, демонстрируют многоуровневую проработку ретроспективных, фундаментальных, клинико-лабораторных, цитогистоморфологических и фармакоэкономических данных, не имеющих литературных аналогов в виде публикаций, позволившие достигнуть цели диссертационного исследования, заключающейся в разработке и клинико-экономическом обосновании технологии лечения лекарственно резистентных бактериальных инфекций глаза с помощью конъюгатов на основе наночастиц (квантовых точек).

Одним из ключевых вопросов, который должен себе создать автор докторской диссертации, заключается в том, на каком уровне, в сравнении с мировыми достижениями находится его работа и почему его мысль пошла именно таким образом? Соответствует ли вектор направления исследований общим тенденциям?

По данному аспекту можно сказать следующее: исходя из углубленного изучения роли и места наночастиц в терапии инфекционных заболеваний глаза, доступные исследования находятся на этапе общей проработки концепции терапии посредством фотоиндуцированных технологий, КТ в частности. В данной диссертационной работе исследователь двинулся в направлении частной медицинской отрасли – офтальмологии и применил современные достижения науки в аспектах фундаментальных и прикладных исследований и для решения конкретных задач. Учитывая тот факт, что отставание между научной мыслью и ее отражением в литературе может достигать 5-10 лет, быть может, в ближайшем будущем частное будет иметь перспективу влияния на общее. Но это – уже тематика дальнейших исследований.

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 G^- и G^+ 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдхиш Р. Бхавсар. Витреоретинальная хирургия / под ред. Абдхиша Р. Бхавсара. – М.: Логосфера, 2013. – 264 с. – Текст: непосредственный.
2. Александрова, О.И. Оценка цитотоксичности слезозаместительных препаратов с использованием системы *in vitro* / О.И. Александрова, И.Н. Околов, Ю.И. Хорольская [и др.]. – Текст: непосредственный // Офтальмология. – 2017. – Т. 14, № 1. – С. 59-66.
3. Андрианов, Е.С. Квантовая наноплазмоника [Текст]: Учеб. пособие / под ред. Е.С. Андрианова, А.П. Виноградова, А.В. Дорофеев, [и др.]. – Долгопрудный: Издательский Дом «Интеллект», 2015. – 368 с. – Текст: непосредственный.
4. Варенко, О.А. Сравнительное изучение криоаппликации и диатермокоагуляции при язвенных кератитах / О.А. Варенко. – Текст: непосредственный // Офтальмология. – Киев, 1973. – С. 25-30.
5. Вечканов, Е.М. Основы клеточной инженерии / Е.М. Вечканов, И.А. Сорокина: Учеб. пособие. - Ростов-на-Дону, 2012. - 136 с. – Текст: непосредственный.
6. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю. А. Владимиров. – Текст: непосредственный // Соросовский общедобразовательный журнал. – 2000. – Т. 6(12). – С. 13-19.
7. Волков, В.В. Мембраны и нанотехнологии / В.В. Волков, Б.В. Мchedlishvili, В.И. Ролдугин [и др.]. – Текст: непосредственный // Российские нанотехнологии. – 2008. – Т. 3, № 11-12. – С. 67-99.
8. Волкович, Т.К. Защитные факторы слезной жидкости и их значение в диагностике заболеваний глаз / Т.К. Волкович. – Текст: непосредственный // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2008. – Т. 7, № 3. – С. 104-109.

9. Гайсина, Г.Я. Обоснование применения глазных лекарственных пленок с моксифлоксацином: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.07 / ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны РФ. – СПб., 2016. – 24 с.
10. Галанов, А.И. Разработка магнитоуправляемой системы для доставки химиопрепаратов на основе наноразмерных частиц железа / А.И. Галанов [и др.]. – Текст: непосредственный // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – № 3 (27). – С. 50-57.
11. Гундорова, Р.А. Травмы глаза / Р.А. Гундорова, А.А. Малаев, А.М. Южаков. – М.: Медицина, 1986. – 193 с. – Текст: непосредственный.
12. Давыдов, А.Б. Разработка высокоэффективного способа лечения широкого спектра болезней, создание и внедрение в медицинскую практику новых лечебных средств – лекарственных пленок и изделий медицинского назначения на основе биосовместимых полимеров / под ред. А.Б. Давыдова, С.Ф. Михайлова. – М.: Инполимед, 2010. – 95 с. – Текст: непосредственный.
13. Децина, А.Н. Выбор клеточной тест-системы для оценки сырья в производстве косметических и некоторых лекарственных средств / А.Н. Децина, Л.Д. Мартынец. – Текст: непосредственный // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 2002. – № 5-6. – С. 66-69.
14. Егоров, В.В. Силиконовая тампонада витреальной полости в хирургическом лечении эндофтальмита / В.В. Егоров, Я.Б. Лебедев, А.Ю. Худяков, Г.П. Смолякова. – Текст: непосредственный // Катарактальная и рефракционная хирургия. – 2012. – № 3. – С. 26-29.
15. Егоров, Н.С. Основы учения об антибиотиках [Текст]: Учеб. для студентов биолог. спец. ун-тов / под ред. Н.С. Егорова – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 1986. – 448 с. – Текст: непосредственный.
16. Егорова, О.Н. Эпидемиология и профилактика синегнойной инфекции: Федеральные клинические рекомендации / О.Н. Егорова, Е.Б. Бруси́на, Е.В. Григорьев. – М., 2014. – 82 с. – Текст: непосредственный.

17. Кански, Д. Клиническая офтальмология: систематизированный подход / Д. Кански; [пер. с англ.]; 2-е изд.; под ред. В.П. Еричева. – Wrocław: Elsevier Urban & Partner, 2009. – 944 с. – Текст: непосредственный.

18. Каспаров, А.А. Клинические особенности герпетического кератита и микродиатермокоагуляция в его лечении: Методические рекомендации / под общ. ред. А.А. Каспарова, В.А. Оганесянц, Г.Е. Горбовицкой, Б.В. Рябоконт. – М., 1989. – Текст: непосредственный.

19. Каспаров, А.А. Лечение гнойных язв роговицы / А.А. Каспаров, А.К. Садыхов, С.А. Маложен. – Текст: непосредственный // Вестник офтальмологии. – 1987. – Т. 103, № 6. – С. 67-71.

20. Каспарова, Е.А. Микродиатермокоагуляция в лечении инфекционных язв роговицы / Е.А. Каспарова, А.В. Зайцев, Е.А. Каспарова, А.А. Каспаров. – Текст: непосредственный // Офтальмология. – 2016. – Т. 13, № 3. – С. 157-162.

21. Каспарова, Е.А. Современные методы лечения гнойных язв роговицы / Е.А. Каспарова. – Текст: непосредственный // Вестник офтальмологии. – 2016. – Т. 132, № 5. – С. 125-135.

22. Каспарова, Е.А. Сочетанное применение микродиатермокоагуляции и локальной экспресс-аутоцитокинотерапии в лечении поверхностных инфекционных язв роговицы / Е.А. Каспарова, А.В. Зайцев, Е.А. Каспарова, Н.Р. Марченко. – Текст: непосредственный // Вестник офтальмологии. – 2012. – Т. 128, № 6. – С. 50-53.

23. Каспарова, Е.А. Способ лечения интраламеллярных корнеосклеральных абсцессов в зоне туннельного разреза после факоэмульсификации / Е.А. Каспарова, А.А. Каспаров. – Текст: непосредственный // Вестник офтальмологии. – 2012. – Т. 128, № 5. – С. 35-38.

24. Кириллова, Ю.М. Динамика восстановления клеток перевиваемой линии МДБК после криоконсервации / Ю.М. Кириллова, Э.М. Плотникова, Е.Ю. Хамзина, И.С. Глаголева. – Текст: непосредственный // Ветеринарная медицина. – 2011. – № 95. – С. 64-66.

25. Котелянский, Э.О. Микродиатермокоагуляция при гнойных язвах роговой оболочки / Э.О. Котелянский. – Текст: непосредственный // Вестник офтальмологии. – 1952. – Т. 3. – С. 4.
26. Лебедев, Я.Б. Отдаленные результаты применения силиконовой тампонады в лечении эндофтальмита / Я.Б. Лебедев, В.В. Егоров, А.Ю. Худяков [и др.]. – Текст: непосредственный // Современные технологии лечения витреоретинальной патологии. – М., 2013. – С. 122.
27. Малюгин, Б.Э. Фармакологическое сопровождение современной хирургии катаракты / под общ. ред. Б.Э. Малюгина, А.А. Шпака, Т.А. Морозовой. – М.: Офтальмология, 2010. – 15 с. – Текст: непосредственный.
28. Мамедов, М.К. Культивируемые клеточные системы – столетие на службе науки / М.К. Мамедов, А.А. Кадырова. – Текст: непосредственный // Биомедицина (Баку). – 2007. – Т. 4. – С. 54-65.
29. Навашин, С.М. Рациональная антибиотикотерапия / С.М. Навашин, И.П. Фомина. – М.: Медицина, 1982. – 496 с. – Текст: непосредственный.
30. Оганесян, О.Г. Аутоконъюнктивальная пластика в ургентной хирургии дефектов роговицы: Автореферат дис. ... канд. мед. наук / МНИИ глазных болезней им. Гельмгольца. – М., 2002. – 24 с.
31. Пономарев, О.П. Технология применения наногибридных биоконъюгатов на основе квантовых точек при патологиях сетчатки / О.П. Пономарев, В.О. Пономарев // Избранные труды Всероссийской конференции по проблемам науки и технологий. – М.: РАН, 2018. – 144 с. – Текст: непосредственный.
32. Романико, О.М. Лечебная и тектоническая кератопластика при язвах роговицы / О.М. Романико, Л.Д. Робман. – Текст: непосредственный // Офтальмологический журнал. – 1983. – Т. 2. – С. 83-86.
33. Труфанов, С.В. Хирургические методы лечения инфекционных кератитов / С.В. Труфанов, Н.П. Шахбазян, А.В. Зайцев, В.Н. Розина. –

Текст: непосредственный // Вестник офтальмологии. – 2021. – Т. 137, № 4. – С. 128-135.

34. Фролычев, И.А. Витрэктомия с временной эндотампонадой ПФОС с заменой на силиконовое масло в лечении послеоперационных эндофтальмитов / И.А. Фролычев, Н.А. Поздеева. – Текст: непосредственный // Вестник ОГУ. – 2013. – № 4 (153). – С. 287-290.

35. Хлебцов, Н.Г. Оптика и биофотоника наночастиц с плазмонным резонансом / Н.Г. Хлебцов. – Текст: непосредственный // Квантовая электроника. – 2008. – Т. 38, № 6. – С. 504-529.

36. Шалунова, Н.В. Требования к клеточным культурам, используемым для производства и контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов / Н.В. Шалунова, В.А. Меркулов, А.В. Комратов [и др.]. – Текст: непосредственный // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2013. – № 1. – С. 28-32.

37. Яковлев, Д.С. Оптимизация МТТ-теста для определения цитотоксичности новых химических соединений на клеточной линии MCF-7 / Д.С. Яковлев, К.Т. Султанова, Е.А. Золотова [и др.]. – Текст: непосредственный // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2020. – № 1. – С. 58-61.

38. Ярмолинская, М.И. Матриксные металлопротеиназы и ингибиторы: классификация, механизм действия / М.И. Ярмолинская, А.С. Молотков, В.М. Денисова. – Текст: непосредственный // Журнал акушерства и женских болезней. – 2012. – Т. LXI, № 1. – С. 113-125.

39. Abbasi, E. Biomedical and biological applications of quantum dots / E. Abbasi, T. Kafshdooz, M. Bakhtiary [et al.]. – Text: immediate // Artif Cells Nanomed Biotechnol. – 2016. – Vol. 44. – № 3. – P. 885-891.

40. Abu Rabe, D.I. The dominant role of surface functionalization in carbon dots' photo-activated antibacterial activity / D.I. Abu Rabe [et al.]. – Text: immediate // Int J Nanomedicine. – 2019. – Vol. 14. – P. 2655-2665.

41. Adjianto, J. CO₂-induced ion and fluid transport in human retinal pigment epithelium / J. Adjianto, T. Banzon, S. Jalickee [et al.]. – Text: immediate // J Gen Physiol. – 2009. – Vol. 133. – № 6. – P. 603-622.
42. Alivisatos, A.P. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots / A. P. Alivisatos. – Text: immediate // Science. – 1996. – Vol. 271. – P. 933-937.
43. Al-Shehri, A. Changing trends in the clinical course and outcome of bacterial keratitis at King Khaled Eye Specialist Hospital / A. Al-Shehri, S. Jastaneiah, M.D. Wagoner. – Text: immediate // Int Ophthalmol. – 2009. – Vol. 29. – № 3. – P. 143-152.
44. Anderson, R.C. Symposium: how a drug is born / R.C. Anderson, H.M. Higgins Jr., C.D. Pettinga. – Text: immediate // Cincinnati J Med. – 1961. – Vol. 42. – P. 49-60.
45. Araujo, H.S. Quantum dots and photodynamic therapy in COVID-19 Treatment / H. S. Araujo, F. Ferreira. – Text: immediate // Quantum Engineering. – 2021. – Vol. 8. – P. 241-250.
46. Axelrod, A.J. Toxicity of intravitreal injection of amphotericin B / A.J. Axelrod, G.A. Peyman, D.J. Apple. – Text: immediate // Am J Ophthalmol. – 1973. – Vol. 76. – P. 578-583.
47. Bains, H.S. Postoperative vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* endophthalmitis / H.S. Bains, D. V. Weinberg, R.S. Feder, G.A. Noskin. – Text: immediate // Arch Ophthalmol. – 2007. – Vol. 125. – № 9. – P. 1292-1293.
48. Bali, E. Vitrectomy and silicone oil in the treatment of acute endophthalmitis. Preliminary results / E. Bali, P. Huyghe, L. Caspers, J. Libert. – Text: immediate // Bull Soc Belge Ophtalmol. – 2003. – Vol. 288. – P. 9-14.
49. Bamdad, S. Ultraviolet A/riboflavin collagen cross-linking for treatment of moderate bacterial corneal ulcers / S. Bamdad, H. Malekhosseini, A. Khosravi. – Text: immediate // Cornea. – 2015. – Vol. 34. – № 4. – P. 402-406.
50. Bardajee, G.R. Efficient and versatile application of fluorescence DNA-conjugated CdTe quantum dots nanoprobe for detection of a specific target

DNA of SARS Cov-2 Virus / G.R. Bardajee, M. Zamani, M. Sharifi. – Text: immediate // *Langmuir*. – 2021. – Vol. 37. – P. 10223-10232.

51. Barnett, J.M. Imaging of endothelial progenitor cell subpopulations in angiogenesis using quantum dot nanocrystals / Ed. by S.J. Rosenthal, D.W. Wright / J.M. Barnett, J.S. Penn, A. Jayagopal. – Text: immediate // *NanoBiotechnology Protocols*. – Totowa, NJ: Humana Press, 2013. – P. 45-56.

52. Barry, P. ESCRS Guidelines for prevention and treatment of endophthalmitis following cataract surgery / P. Barry, L. Cordoves, S. Gardner. – Text: immediate. – Co Dublin: Temple House, Temple Road, Blackrock, 2013. – P. 1-47.

53. Bartlett, J.G. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics / J.G. Bartlett, D.N. Gilbert, B. Spellberg. – Text: immediate // *Clin Infect Dis*. – 2013. – Vol. 56. – № 10. – P. 1445-1450.

54. Barza, M. Pharmacokinetics of intravitreal carbenicillin, cefazolin, and gentamicin in rhesus monkeys / M. Barza, A. Kane, J. Baum. – Text: immediate // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 1983. – Vol. 24. – № 12. – P. 1602-1606.

55. Baum, J. Intravitreal administration of antibiotic in the treatment of bacterial endophthalmitis. III. Consensus / J. Baum, G. A. Peyman, M. Barza. – Text: immediate // *Surv Ophthalmol*. – 1982. – Vol. 26. – № 4. – P. 204-206.

56. Bernard, H. Ceftazidime or amikacin: choice of intravitreal antimicrobials in the treatment of postoperative endophthalmitis / H. Bernard, M. Barza. – Text: immediate // *Arch Ophthalmol*. – 1994. – Vol. 112. – № 1. – P. 17-18.

57. Bhende, S. In vitro assessment of microbial barrier properties of Dermabond topical skin adhesive / S. Bhende, S. Rothenburger, D.J. Spangler, M. Dito. – Text: immediate // *Surg Infect (Larchmt)*. – 2002. – Vol. 3. – № 3. – P. 251-257.

58. Blair, J. Comparison of antibiotic-only and antibiotic-steroid combination treatment in corneal ulcer patients: double-blinded randomized clinical trial / J. Blair, W. Hodge, S. Al-Ghamdi [et al.]. – Text: immediate // *Can J Ophthalmol*. – 2011. – Vol. 46. – № 1. – P. 40-45.

59. Campochiaro, P.A. Aminoglycoside Toxicity Study Group / P.A. Campochiaro, J.I. Lim. – Text: immediate // Arch Ophthalmol. – 1994. – Vol. 112. – P. 48-53.
60. Carlini, L. Reduced dyes enhance single-molecule localization density for live superresolution imaging / L. Carlini [et al.]. – Text: immediate // ChemPhysChem. – 2014. – Vol. 15. – P.750-755.
61. Carones, F. Evaluation of the prophylactic use of mitomycin-C to inhibit haze formation after photorefractive keratectomy / F. Carones, L. Vigo, E. Scandola, L. Vacchini. – Text: immediate // J Cataract Refract Surg. – 2002. – Vol. 28. – P. 2088-2095.
62. Chand, P. Synergism of zinc oxide quantum dots with antifungal drugs: potential approach for combination therapy against drug resistant candida albicans / P. Chand, S. Kumari, N. Mondal [et al.]. – Text: immediate // Front Nanotechnol. – 2021. – Vol. 9. – P. 145-154.
63. Cheeseman, K.H. An introduction to free radical biochemistry / K.H. Cheeseman, T.F. Slater. – Text: immediate // Br Med Bull. – 1993. – Vol. 49. – P. 481-493.
64. Chen, J.H. Amniotic membrane transplantation for pseudomonal keratitis with impending perforation / J.H. Chen, D.H. Ma, R.J. Tsai. – Text: immediate // Chang Gung Med J. – 2002. – Vol. 25. – P. 144-152.
65. Chen, W.L. Therapeutic penetrating keratoplasty for microbial keratitis in Taiwan from 1987 to 2001 / W.-L. Chen, C.-Y. Wu, F.-R. Hu, I.-J. Wang. – Text: immediate // Am J Ophthalmol. – 2004. – Vol. 137. – № 4. – P. 736-743.
66. Chrapeka, O. The in vitro antimicrobial activity of silicone oils used in ophthalmic surgery / O. Chrapeka, R. Vecerovab, D. Koukalovab [et al.]. – Text: immediate // Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. – 2012. – Vol. 156. – № 1. – P. 7-13.
67. Clark, N.C. FCT Comparison of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolates from Michigan and Pennsylvania / N.C.

Clark, L.M. Weigel, J.B. Patel. – Text: immediate // Antimicrobial Agents and Chemother. – 2005. – Vol. 49. – P. 470-472.

68. Coco, R.M. Pharmacokinetics of intravitreal vancomycin in normal and infected rabbit eyes / R.M. Coco, M.I. López, J.C. Pastor, M.J. Nozal. – Text: immediate // J Ocul Pharmacol Ther. – 1998. – Vol. 14. – № 6. – P. 555-563.

69. Comer, G.M. Intravitreal Daptomycin: A safety and efficacy study / G.M. Comer, J.B. Miller, E.W. Schneider [et al.]. – Text: immediate // Retina. – 2011. – Vol. 31. – № 6. – P. 1199-1206.

70. Courtney, C.M. Photoexcited quantum dots for killing multidrug-resistant bacteria / C.M. Courtney, S.M. Goodman, J.A. McDaniel [et al.]. – Text: immediate // Nat. Mater. – 2016. – Vol. 15. – P. 529-534.

71. Courtney, C.M. Potentiating antibiotics in drug-resistant clinical isolates via stimuli-activated superoxide generation / C.M. Courtney, S.M. Goodman, T. A. Nagy [et al.]. – Text: immediate // Sci Adv. – 2017. – Vol. 3. – № 10. – P. 1-10.

72. Cross, A.R. Enzymic mechanisms of superoxide production / A.R. Cross, O.T.G. Jones. – Text: immediate // Biochem Biophys Acta. – 1991. – Vol. 1057. – P. 281-298.

73. Daily, M.J. Intravitreal injection of methicillin for treatment of endophthalmitis / M.J. Daily, G.A. Peyman, G. Fishman. – Text: immediate // Am J Ophthalmol. – 1973. – Vol. 76. – P. 343-350.

74. Davies, J. Darwin and microbiomes / J. Davies. – Text: immediate // EMBO Rep. – 2009. – Vol. 10. – № 8. – P. 805.

75. de Almeida Manzano, R.P. Antibacterial analysis in vitro of ethylcyanoacrylate against ocular pathogens / R.P. de Almeida Manzano, S.C. Naufal, R.Y. Hida [et al.]. – Text: immediate // Cornea. – 2006. – Vol. 25. – P. 350-351.

76. Deshpande, L.M. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program / L.M. Deshpande, T.R. Fritsche,

G.J. Moet [et al.]. – Text: immediate // Diagnostic Microbiology & Infectious Disease. – 2007. – Vol. 58. – № 2. – P. 163-170.

77. Dong, X. Carbon dots as potent antimicrobial agents / X. Dong [et al.]. – Text: immediate // Theranostics. – 2020. – Vol. 10. – № 2. – P. 671-686.

78. Donnenfeld, E.D. Therapeutic keratoplasty / E.D. Donnenfeld, R. Solomon // Cornea. – 2nd ed. / J.H. Krachmer, M.J. Mannis, E.J. Holland. – Text: immediate. – New York: Mosby, 2005. – Vol. 2. – P. 1695-1705.

79. Dua, H.S. The amniotic membrane in ophthalmology / H.S. Dua, G. Gomes, A. King – Text: immediate // Surv Ophthalmol. – 2004. – Vol. 49. – № 1. – P. 51-77.

80. Duncan, T.J. A novel method using quantum dots for testing the barrier function of cultured epithelial cell sheets / T.J. Duncan, K. Baba, Y. Oie [et al.]. – Text: immediate // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2015. – Vol. 56. – № 4. – P. 2215-2223.

81. Durand, M.L. The post-endophthalmitis vitrectomy study era / M.L. Durand. – Text: immediate // Arch Ophthalmol. – 2002. – Vol. 120. – № 2. – P. 233-234.

82. Eiferman, R.A. Antibacterial effect of cyanoacrylate glue / R.A. Eiferman, J.W. Snyder. – Text: immediate // Arch Ophthalmol (Chicago, Ill: 1960). – 1983. – Vol. 101. – P. 958-960.

83. Esmaeli, B. Endogenous endophthalmitis secondary to vancomycin-resistant enterococci infection / B. Esmaeli, E. Holz, A. Ahmadi [et al.]. – Text: immediate // Retina. – 2003. – Vol. 23. – № 1. – P.118-119.

84. Ferrari, T.M. Escherichia coli keratitis treated with ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking: a case report / T. M. Ferrari, M. Leozappa, M. Lorusso [et al.]. – Text: immediate // Eur J Ophthalmol. – 2009. – Vol. 19. – № 2. – P. 295-297.

85. Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenza / A. Fleming. – Text: immediate // Br J Exp Pathol. – 1929. – Vol. 10. – № 3. – P. 226-236.

86. Gambato, C. Mitomycin C modulation of corneal wound healing after photorefractive keratectomy in highly myopic eyes / C. Gambato, A. Ghirlando, E. Moretto [et al.]. – Text: immediate // Ophthalmology. – 2005. – Vol. 112. – P. 208-218.
87. Garner, I. Carbon dots fabrication: ocular imaging and therapeutic potential / I. Garner [et al.]. – Text: immediate // Biotechnol. – 2020. – Vol. 9. – P. 478-486.
88. Genicio, N. Quantum dot labeling and tracking of cultured limbal epithelial cell transplants in-vitro / N. Genicio, J.G. Paramo, A.J. Shortt. – Text: immediate // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2015. – Vol. 56. – № 5. – P. 3051-3059.
89. Gicquel, J.J. Amniotic membrane transplantation in severe bacterial keratitis / J.J. Gicquel, R.A. Bejjani, P. Ellies [et al.]. – Text: immediate // Cornea. – 2007. – Vol.26. – P. 27-33.
90. Gillis, L.M. DCS Vancomycin-tolerance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Mississippi during 1999-2001 / L.M. Gillis, H.D. White, A. Whitehurst. – Text: immediate // Am J Medical Sciences. – 2005. – Vol. 330. – P. 65-68.
91. Goel, N. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* endophthalmitis in a silicone oil-filled eye treated with piperacillin/tazobactam: report of a case and review of literature / N. Goel, V. Bhambhwani, B. Ghosh. – Text: immediate // Int Ophthalmol. – 2015. – Vol. 35. – № 4. – P. 599-602.
92. Goodman, M. designing superoxide-generating quantum dots for selective light-activated nanotherapy / M. Goodman, M. Levy, L. Fei-Fei [et al.]. – Text: immediate // Front Chem. – 2018. – Vol. 46. – № 6. – P. 1-12.
93. Goodrich, R.P. The Mirasol PRT system for pathogen reduction of platelets and plasma: an overview of current status and future trends / R.P. Goodrich, R.A. Edrich, J. Li, J. Seghatchian. – Text: immediate // Transfus Apher Sci. – 2006. – Vol. 35. – № 1. – P. 5-17.

94. Grzybowski, A. Microbial flora and resistance in ophthalmology: a review / A. Grzybowski, P. Brona, S.J. Kim. – Text: immediate // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* – 2017. – Vol. 255. – № 5. – P. 851-862.
95. Gullberg, E. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations / E. Gullberg, S. Cao, O. Berg [et al.]. – Text: immediate // *PLoS Pathog.* – 2011. – Vol. 7. – № 7.
96. Gussin, H.A. Binding of muscimol-conjugated quantum dots to GABAC receptors / H.A. Gussin, I.D. Tomlinson, D.M. Little [et al.]. – Text: immediate // *J Am Chem Soc.* – 2006. – Vol. 128. – № 49. – P.15701-15713.
97. Gussin, H.A. GABAC receptor binding of quantum-dot conjugates of variable ligand valency / H.A. Gussin, I.D. Tomlinson, N.J. Muni [et al.]. – Text: immediate // *Bioconjug Chem.* – 2010. – Vol. 21. – № 8. – P. 1455-1464.
98. Haden, H.C. Metastatic endophthalmitis associated by epidemic cerebro-spinal meningitis / H.C. Haden. – Text: immediate // *Am J Ophthalmol.* – 1918. – Vol. 1. – № 9. – P. 647-650.
99. Hafezi, F. PACK-CXL: defining CXL for infectious keratitis / F. Hafezi, B.J. Randlman. – Text: immediate // *Refract Surg.* – 2014. – Vol. 30. – № 7. – P. 438-439.
100. Han, D.P. Spectrum and susceptibilities of microbiologic isolates in the Endophthalmitis Vitrectomy Study / D.P. Han, S.R. Wisniewski, L.A. Wilson [et al.]. – Text: immediate // *Am J Ophthalmol.* – 1996. – Vol. 122. – P. 1-17.
101. Hardman, R. A Toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors / R. Hardman. – Text: immediate // *Environ Health Perspect.* – 2006. – Vol. 114. – № 2. – P. 165-172.
102. Hayashi, K. Expression of transforming growth factor-beta in wound healing of vitamin A-deficient rat corneas / K. Hayashi, G. Frangieh, G. Wolf [et al.]. – Text: immediate // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 1989. – Vol. 30. – P. 239.
103. Hegazy, H.M. Evaluation of toxicity of intravitreal ceftazidime, vancomycin, and ganciclovir in a silicone oil-filled eye / H.M. Hegazy, M. Kivilcim, G.A. Peyman [et al.]. – Text: immediate // *Retina.* – 1999. – Vol. 19. – P. 553-557.

104. Hennig, R. Multivalent nanoparticles bind the retinal and choroidal vasculature / R. Hennig, A. Ohlmann, J. Staffel [et al.]. – Text: immediate // J Control Release. – 2015. – Vol. 220. – P. 265-274.
105. Herretes, S. Topical corticosteroids as adjunctive therapy for bacterial keratitis / S. Herretes, X. Wang, J.M. Reyes. – Text: immediate // Cochrane Database Syst Rev. – 2014. – Vol. 10. – P. 256-259.
106. Hillier, R.J. Post-traumatic vancomycin-resistant enterococcal endophthalmitis / R.J. Hillier, P. Arjmand, G. Rebeck [et al.]. – Text: immediate // J Ophthalmic Inflamm Infect. – 2013. – Vol. 3. – P. 42.
107. Hirst, L.W. Phialophora corneal ulcer / L.W. Hirst, K. Stallard, M. Whitby [et al.]. – Text: immediate // Aust N Z J Ophthalmol. – 1995. – Vol. 23. – № 3. – P. 223-225.
108. Ho, J.H.C. Isolation and characterization of multi-potent stem cells from human orbital fat tissues / J.H.C. Ho, W. H. Ma, T.C. Tseng [et al.]. – Text: immediate // Tissue Eng Part A. – 2011. – Vol. 17. – № 1-2. – P. 255-266.
109. Hooper, D.C. Target modification as a mechanism of antimicrobial resistance / D.C. Hooper, K. Lewis, A.A. Salyers [et al.] // Bacterial Resistance to Antimicrobials. – Text: immediate // New York: Marcel Dekker, Inc., 2002. – P. 161-182.
110. Imlay, J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium / J.A. Imlay. – Text: immediate // Nat Rev Microbiol. – 2013. – Vol. 11. – P. 443-454.
111. Irving, H. Postoperative intraocular infections / H. Irving, I.H. Leopold, L. Apt. – Text: immediate // Am J Ophthalmol. – 1960. – Vol. 50. – P. 1225-1247.
112. Iseli, H.P. Ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking for infectious keratitis associated with corneal melts / H.P. Iseli, M.A. Thiel, F. Hafezi [et al.]. – Text: immediate // Cornea. – 2008. – Vol. 27. – № 5. – P. 590-594.
113. Jackson, T. Quiroz-Mercado H. Intravitreal quantum dots for retinitis pigmentosa: a first-in-human safety study / T. Jackson, N. Mandava. – Text: immediate // Nanomedicine. – 2021. – Vol. 16. – № 8. – P. 62-68.

114. Jian, H.J. SuperCationic carbon quantum dots synthesized from spermidine as an eye drop formulation for topical treatment of bacterial keratitis / H.J. Jian, R.S. Wu, T.Y. Lin [et al.]. – Text: immediate // ACS Nano. – 2017. – Vol. 11. – № 7. – P. 6703-6716.
115. Jin, H. Evolving risk factors and antibiotic sensitivity patterns for microbial keratitis at a large county hospital / H. Jin, W.T. Parker, N.W. Law [et al.]. – Text: immediate // Br J Ophthalmol. – 2017. – Vol. 101. – № 11. – P. 1483-1487.
116. Jo, J.H. InP-Based quantum dots having an InP core, composition-gradient ZnSeS inner shell, and ZnS outer shell with sharp, bright emissivity, and blue absorptivity for display devices / J.H. Jo, D.Y. Jo, S.H. Lee [et al.]. – Text: immediate // ACS Applied Nano Materials. – 2020. – Vol. 3. – № 2. – P. 1972-1980.
117. Johnson, F. A simple method of measuring aqueous humor flow with intravitreal fluoresceinated dextrans / F. Johnson, D. Maurice. – Text: immediate // Exp Eye Res. – 1984. – Vol. 39. – P. 791-805
118. Jones, D.B. Decision-making in the management of microbial keratitis / D.B. Jones. – Text: immediate // Ophthalmology. – 1981. – Vol. 88. – P. 814-820.
119. Kansal, V. Endogenous methicillin-resistant Staphylococcus aureus endophthalmitis secondary to axillary phlegmon: a case report / V. Kansal, E. Rahimy, S. Garg [et al.]. – Text: immediate // Can J Ophthalmol. – 2017. – Vol. 52. – № 3. – P. 97-99.
120. Karakocak, B.B. Biocompatibility of gold nanoparticles in retinal pigment epithelial cell line / B. B. Karakocak, R. Raliya, J.T. Davis [et al.]. – Text: immediate // Toxicol in Vitro. – 2016. – Vol. 37. – P. 61-69.
121. Kasner, D. Surgical treatment of amyloidosis of the vitreous / D. Kasner, G.R. Miller, W.H. Taylor [et al.]. – Text: immediate // Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol. – 1968. – Vol. 72. – P. 410-418.
122. Kasner, D. Vitrectomy: a new approach to the management of vitreous / D. Kasner. – Text: immediate // Highlights Ophthalmol. – 1968. – Vol. 11. – P. 304-329.

123. Keller, K.E. Segmental versican expression in the trabecular meshwork and involvement in outflow facility / K.E. Keller, J.M. Bradley, J.A. Vranka [et al.]. – Text: immediate // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2011. – Vol. 52. – № 8. – P. 5049-5057.
124. Kevin, J. Biocompatible near-infrared quantum dots delivered to the skin by microneedle patches record vaccination / J. Kevin, McHugh [et al.]. – Text: immediate // Science Translation Medicine. – 2019. – Vol. 12. – P. 48-51.
125. Khanal, S. Nanoscale phase dynamics of the normal tear film / S. Khanal, T.J. Millar. – Text: immediate // Nanomed-Nanotechnol. – 2010. – Vol. 6. – № 6. – P. 707-713.
126. Khlyustova, A. The Effect of pH on OH radical generation in aqueous solutions by atmospheric pressure glow discharge / A. Khlyustova [et al.]. – Text: immediate // Plasma Chemistry and Plasma Processing. – 2016. – Vol. 36. – P. 1229-1238.
127. Khodadoust, A. Microsurgical approach to the conjunctival flap / A. Khodadoust, A.P. Quinter. – Text: immediate // Arch Ophthalmol (Chicago, Ill: 1960). – 2003. – Vol. 121. – P. 1189-1193.
128. Kijlstra, A. The role of cytokines in ocular inflammation / A. Kijlstra. – Text: immediate // Br J Ophthalmology. – 1994. – Vol. 78. – P. 885-887.
129. Killingsworth, D.W. Results of therapeutic penetrating keratoplasty / D.W. Killingsworth, G.A. Stern, W.T. Driebe [et al.]. – Text: immediate // Ophthalmology. – 1993. – Vol. 100. – № 4. – P. 534-541.
130. Kim, J.H. Intravenously administered gold nanoparticles pass through the blood-retinal barrier depending on the particle size, and induce no retinal toxicity / J.H. Kim, J.H. Kim, K.W. Kim [et al.]. – Text: immediate // Nanotechnology. – 2009. – Vol. 20. – № 50. – P. 59-64.
131. Kim, J.Y. Safety of Nonporous silica nanoparticles in human corneal endothelial cells / J.Y. Kim, J.H. Park, M. Kim [et al.] – Text: immediate // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – P. 258-267.

132. Kinnula, V.L. Antioxidant defense mechanisms in human neutrophils / V.L. Kinnula, Y. Soini, K. Kvist-Makela [et al.]. – Text: immediate // *Antioxid Redox Signal.* – 2002. – Vol. 4. – № 1. – P. 27-34.
133. Kiyoo, N. Interaction between corneal invasion of polymorphonuclear leukocytes and corneal epithelium / N. Kiyoo. – Text: immediate // *Nippon Ganka Gakkai Zasshi.* – 1990. – Vol. 94. – P. 445-456.
134. Knyazer, B. Accelerated corneal cross-linking with photoactivated chromophore for moderate therapy-resistant infectious keratitis / B. Knyazer, Y. Krakauer, Y. Baumfeld [et al.]. – Text: immediate // *Cornea.* – 2018. – Vol. 37. – № 4. – P. 528-531.
135. Kuhn, F. Ten years after. Are findings of the Endophthalmitis Vitrectomy Study still relevant today? / F. Kuhn, G. Gini. – Text: immediate // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* – 2005. – Vol. 243. – P. 1197-1199.
136. Kuhn, F. Vitrectomy for endophthalmitis / F. Kuhn, G. Gini. – Text: immediate // *Ophthalmology.* – 2006. – Vol. 113. – № 4. – P. 714.
137. Kumar Sahu, S. Clinico-microbiological profile and treatment outcome of infectious scleritis: Experience from a tertiary eye care center of India / S. Kumar Sahu, S. Das, S. Sharma, K. Sahu. – Text: immediate // *Int J Inflam.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 1-8.
138. Kunimoto, D.Y. Wills Eye Retina Service. Incidence of endophthalmitis after 20- and 25-gauge vitrectomy / D.Y. Kunimoto, R.S. Kaiser. – Text: immediate // *Ophthalmology.* – 2007. – Vol. 114. – № 12. – P. 2133-2137.
139. Kwan, B.W. Combatting bacterial infections by killing persister cells with mitomycin C / B.W. Kwan, N. Chowdhury, T.K. Wood. – Text: immediate // *Environ Microbiol.* – 2015. – Vol. 17. – P. 4406-4414.
140. Lalitha, P. Nocardia keratitis: clinical course and effect of corticosteroids / P. Lalitha, M. Srinivasan, R. Rajaraman [et al.]. – Text: immediate // *Am J Ophthalmol.* – 2012. – Vol. 154. – № 6. – P. 934-939.

141. Lee, S.H. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration / S.H. Lee, S.C. Tseng. – Text: immediate // *Am J Ophthalmol.* – 1997. – Vol. 123. – P. 303-312.
142. Levinson, M.E. Pharmacodynamics of antibacterial drugs / M.E. Levinson. – Text: immediate // *Infect Dis Clin N Am.* – 2000. – Vol. 14. – P. 281-291.
143. Li, H.R. In vivo near infrared fluorescence imaging and dynamic quantification of pancreatic metastatic tumors using folic acid conjugated biodegradable mesoporous silica nanoparticles / H.R. Li, K. Li, Y.P. Dai [et al.]. – Text: immediate // *Nanomed-Nanotechnol.* – 2018. – Vol. 14. – № 6. – P. 1867-1877.
144. Lin, A. Bacterial Keratitis Preferred Practice Pattern® / A. Lin, M.K. Rhee, E.K. Akpek [et al.]. – Text: immediate // *Ophthalmology.* – 2019. – Vol. 126. – № 1. – P. 1-55.
145. Liu, B.R. Synthesis, characterization and applications of carboxylated and polyethylene-glycolated bifunctionalized InP/ZnS quantum dots in cellular internalization mediated by cell-penetrating peptides. – Text: immediate // *Colloids and Surfaces B.: Biointerfaces.* – 2013. – Vol. 111. – P. 162-170.
146. Lu, F. Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles / F. Lu, S.H. Wu, Y. Hung [et al.]. – Text: immediate // *Small.* – 2009. – Vol. 5. – № 12. – P. 1408-1413.
147. Lushniak, B.D. Antibiotic resistance: a public health crisis / B.D. Lushniak. – Text: immediate // *Public Health Rep.* – 2014. – Vol. 129. – № 4. – P. 314-316.
148. Luyt, C.E. Antibiotic stewardship in the intensive care unit / C.E. Luyt, N. Brechot, J.L. Trouillet, J. Chastre. – Text: immediate // *Crit Care.* – 2014. – Vol. 18. – № 5. – P. 480.
149. Machemer, R. A new concept for vitreous surgery. I. Instrumentation / R. Machemer, J.M. Parel, E.W.D. Norton. – Text: immediate // *Am J Ophthalmol Otolaryngol.* – 1972. – Vol. 10. – P. 172-177.

150. Machemer, R. A new concept for vitreous surgery. II. Surgical technique and complications / R. Machemer. – Text: immediate // *Am J Ophthalmol.* – 1972. – Vol. 74. – P. 1022-1033.
151. Machemer, R. Vitrectomy: a pars plana approach / R. Machemer, H. Buettner, E.W.D. Norton. – Text: immediate // *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* – 1971. – Vol. 75. – P. 813-820.
152. Makdoui, K. Infectious keratitis treated with corneal crosslinking / K. Makdoui, J. Mortensen, S. Crafoord [et al.]. – Text: immediate // *Cornea.* – 2010. – Vol. 29. – № 12. – P. 1353-1358.
153. Makdoui, K. UV A riboflavin photochemical therapy of bacterial keratitis: a pilot study / K. Makdoui, J. Mortensen, O. Sorkhabi [et al.]. – Text: immediate // *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* – 2012. – Vol. 250. – P. 95-102.
154. Malhotra, C. Human amniotic membrane transplantation: Different modalities of its use in ophthalmology / C. Malhotra, A.K. Jain. – Text: immediate // *World J Transplant.* – 2014. – Vol. 4. – P. 111-121.
155. Malik, S.R. Therapeutic keratoplasty in *Pseudomonas pyocyaneus* corneal ulcers / S.R. Malik, G. Singh. – Text: immediate // *Br J Ophthalmol.* – 1971. – Vol. 55. – № 5. – P. 326-330.
156. Manivannan, S. Quantum dots as a promising agent to combat COVID-19 / S. Manivannan, K. Ponnuchamy. – Text: immediate // *Applied Organometallic Chemistry.* – 2020. – Vol. 4. – P. 110-116.
157. Marschner, S. Pathogen Reduction Technology Treatment of Platelets. Plasma and whole blood using riboflavin and UV light / S. Marschner, R. Goodrich. – Text: immediate // *Transfus Med Hemother.* – 2011. – Vol. 38. – № 1. – P. 8-18.
158. McElvanney, A.M. Doxycycline in the management of *pseudomonas* corneal melting: Two case reports and a review of the literature / A.M. McElvanney. – Text: immediate // *Eye Contact Lens.* – 2003. – Vol. 29. – P. 258-261.
159. McGuire, J.M. Vancomycin, a new antibiotic. II. In vitro antibacterial studies / J.M. McGuire, R.N. Wolfe, D.W. Ziegler. – Text: immediate // *Antibiot Annu.* – 1955. – Vol. 3. – P. 612-618.

160. McLeod, S.D. The role of smears, cultures, and antibiotic sensitivity testing in the management of suspected infectious keratitis / S.D. McLeod, A. Kolahdouz-Isfahani, K. Rostamian [et al.]. – Text: immediate // *Ophthalmology*. – 1996. – Vol. 03. – № 1. – P. 23-28.
161. Michael, C.A. The antibiotic resistance crisis: causes, consequences, and management / C.A. Michael, D. Dominey-Howes, M. Labbate. – Text: immediate // *Front Public Health*. – 2014. – Vol. 2. – P. 145.
162. Michalet, X. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics / X. Michalet, F.F. Pinaud, L.A. Bentolila [et al.]. – Text: immediate // *Science*. – 2005. – Vol. 307. – № 5709. – P. 538-544.
163. Miller, D. Update on the epidemiology and antibiotic resistance of ocular infections / D. Miller. – Text: immediate // *Middle East Afr J Ophthalmol*. – 2017. – Vol. 24. – № 1. – P. 30-42.
164. Mohan, M. Topical silver sulphadiazine: a new drug for ocular keratomycosis / M. Mohan, S.K. Gupta, V.K. Kalra [et al.]. – Text: immediate // *Br J Ophthalmol*. – 1988. – Vol. 72. – P. 192-195.
165. Mohan, S. Role of multilayered amniotic membrane transplantation for the treatment of resistant corneal ulcers in North India / S. Mohan, I. Budhiraja, A. Saxena [et al.]. – Text: immediate // *Int Ophthalmol*. – 2014. – Vol. 34. – P. 485-491.
166. Muller, L. Corneal cross-linking as supplementary treatment option in melting keratitis: a case series / L. Muller, M.A. Thiel, A.I. Kipfer-Kauer, C. Kaufmann. – Text: immediate // *Klin Monbl Augenheilkd*. – 2012. – Vol. 229. – P. 411-415.
167. Nguyen, J. Successful management of post-traumatic vancomycin-resistant enterococcus endophthalmitis / J. Nguyen, M.E. Hartnett. – Text: immediate // *Am J Ophthalmol Case Rep*. – 2017. – Vol. 5. – P. 117-118.
168. Nikazar, S. Revisiting the cytotoxicity of quantum dots: an in-depth overview / S. Nikazar [et al.]. – Text: immediate // *Biophys Rev*. – 2020. – Vol. 12. – P. 703-718.

169. Nikhil Gokhale, S. Medical management approach to infectious keratitis / S. Nikhil Gokhale. – Text: immediate // *Ind J Ophthalmol.* – 2008. – Vol. 56. – № 3. – P. 215-220.
170. No authors listed. Results of the Endophthalmitis Vitrectomy Study. – Text: immediate // *Arch Ophthalmol.* – 1995. – Vol. 113. – № 12. – P. 1479-1496.
171. No authors listed. The antibiotic alarm. – Text: immediate // *Nature.* – 2013. – Vol. 495. – № 7440. – P. 14.
172. Notara, M. The impact of age on the physical and cellular properties of the human limbal stem cell niche / M. Notara, A.J. Shortt, A.R. O'Callaghan, J.T. Daniels. – Text: immediate // *Age (Dordr).* – 2013. – Vol. 35. – № 2. – P. 289-300.
173. Novak, R. Emergence of vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumonia* / R. Novak, B. Henriques, E. Charpentier [et al.]. – Text: immediate // *Nature.* – 1999. – Vol. 399. – № 6736. – P. 590-593.
174. Nubile, M. In vivo analysis of stromal integration of multilayer amniotic membrane transplantation in corneal ulcers / M. Nubile, H.S. Dua, M. Lanzini [et al.]. – Text: immediate // *Am J Ophthalmol.* – 2011. – Vol. 151. – P. 809-822.
175. O'Malley, C. Vitrectomy via the pars plana – a new instrument system / C. O'Malley, R.M. Heintz. – Text: immediate // *Trans Pac Coast Otoophthalmol Soc Annu Meet.* – 1972. – Vol. 53. – P. 121-137.
176. O'Malley, C. Vitrectomy with an alternative instrument system / C. O'Malley, R.M. Heintz. – Text: immediate // *Ann Ophthalmol.* – 1975. – Vol. 7. – № 4. – P. 585-588.
177. Olson, J.L. Intravitreal silicon-based quantum dots as neuroprotective factors in a model of retinal photoreceptor degeneration / J.L. Olson, R. Velez-Montoya, N. Mandava [et al.]. – Text: immediate // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2012. – Vol. 53. – № 9. – P. 5713-5721.
178. Ozkiris, A. Determination of nontoxic concentrations of piperacillin/tazobactam for intravitreal application: an electroretinographic,

histopathologic and morphometric analysis / A. Ozkiris, C. Evereklioglu, O. Kontas [et al.]. – Text: immediate // *Ophthalmic Res.* – 2004. – Vol. 36. – P. 139-144.

179. Park, J. Community practice patterns for bacterial corneal ulcer evaluation and treatment / J. Park, K.M. Lee, H. Zhou [et al.]. – Text: immediate // *Eye Contact Lens.* – 2015. – Vol. 41. – № 1. – P. 12-18.

180. Pathak, S. Quantum dot labeling and imaging of glial fibrillary acidic protein intermediate filaments and gliosis in the rat neural retina and dissociated astrocytes / S. Pathak, R. Tolentino, K. Nguyen [et al.]. – Text: immediate // *J Nanosci Nanotechnol.* – 2009. – Vol. 9. – № 8. – P. 5047-5054.

181. Pathengay, A. Intravitreal piperacillin/tazobactam in the management of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* endophthalmitis / A. Pathengay, A. Mathai, G.Y. Shah, S. Ambatipudi. – Text: immediate // *J Cataract Refract Surg.* – 2010. – Vol. 36. – № 12. – P. 2210-2211.

182. Pearson, P.A. Clearance and distribution of ciprofloxacin after intravitreal injection / P.A. Pearson, D.P. Hainsworth, P. Ashton. – Text: immediate // *Retina.* – 1993. – Vol. 13. – № 4. – P. 326-330.

183. Petras, J. Generation of nitrogen oxide and oxygen radicals by quantum dots / J. Petras [et al.]. – Text: immediate // *J Biomedical Nanotechnol.* – 2008. – Vol. 4. – P. 450-456.

184. Peyman, G.A. Advances in uveal surgery, vitreous surgery, and the treatment of endophthalmitis / G.A. Peyman, D.R. Sanders // New York: Appleton-Century-Crofts, 1975. – P. 184-208. – Text: immediate.

185. Peyman, G.A. Endophthalmitis. Diagnosis and Management / G.A. Peyman, P.J. Lee, D.V. Seal. – Text: immediate // Taylor & Francis. – 2004. – Vol. 111.

186. Peyman, G.A. Experimental vitrectomy: instrumentation and surgical technique / G.A. Peyman, N.A. Dodich. – Text: immediate // *Arch Ophthalmol.* – 1971. – Vol. 86. – P. 548-551.

187. Peyman, G.A. Intravitreal drug therapy / G.A. Peyman, J.A. Schulman – Text: immediate // *Jpn J Ophthalmol.* – 1989. – Vol. 33. – № 4. – P. 392-404.

188. Peyman, G.A. Intravitreal surgery: Principles and Practice. 2-nd ed. / G.A. Peyman, J.A. Schulman. – Norwalk, CT: Appleton & Lange, 1994. – P. 851-922. – Text: immediate.
189. Peyman, G.A. Postoperative endophthalmitis: experimental aspects and their clinical applications / G.A. Peyman, D.W. Vastine, M. Raichard. – Text: immediate // Ophthalmology. – 1978. – Vol. 85. – P. 374-385.
190. Pflugfelder, S.C. Intravitreal vancomycin. Retinal toxicity, clearance, and interaction with gentamicin / S.C. Pflugfelder, E. Hernandez, S.J. Fliesler [et al.]. – Text: immediate // Arch Ophthalmol. – 1987. – Vol. 105. – P. 831-837.
191. Piddock, L.J. The crisis of no new antibiotics-what is the way forward? / L.J. Piddock. – Text: immediate // Lancet Infect Dis. – 2012. – Vol. 12. – № 3. – P. 249-253.
192. Piguet, B. Rétinopathie toxic sur injection intravitréenne d'Amikacine et Vancomycine / B. Piguet, C. Chobaz, P.A. Gounauer. – Text: immediate // Klin Monatsbl Augenheilkd. – 1996. – Vol. 208. – P. 358-359.
193. Pinarci, E.Y. The results of pars plana vitrectomy and silicone oil tamponade for endophthalmitis after intravitreal injections / E.Y. Pinarci, N. Yesilirmak, S.A. Bayar [et al.]. – Text: immediate // Int Ophthalmol. – 2013. – Vol. 33. – № 4. – P. 361-365.
194. Pinheiro, R. The impact of glaucoma medications on corneal wound healing / R. Pinheiro, C. Panfil, N. Schragc, R.M. Dutescu. – Text: immediate // J Glaucoma. – 2016. – Vol. 25. – № 1. – P. 122-127.
195. Pollinger, K. Ligand-functionalized nanoparticles target endothelial cells in retinal capillaries after systemic application / K. Pollinger, R. Hennig, A. Ohlmann [et al.]. – Text: immediate // Proc Natl Acad Sci USA. – 2013. – Vol. 110. – № 15. – P. 6115-6120.
196. Pong, B.K. Modified ligand-exchange for efficient solubilization of CdSe/ZnS quantum dots in water: A procedure guided by computational studies / B.K. Pong, B.L. Trout, J.Y. Lee. – Text: immediate // Langmuir. – 2008. – Vol. 24. – № 10. – P. 5270-5276.

197. Ray, K.J., Early addition of topical corticosteroids in the treatment of bacterial keratitis / K. J. Ray, M. Srinivasan, J. Mascarenhas [et al.]. – Text: immediate // JAMA Ophthalmol. – 2014. – Vol. 132. – № 6. – P. 737-741.
198. Read, A.F. Antibiotic resistance management / A.F. Read, R.J. Woods. – Text: immediate // Evol. Med. Public Health. – 2014. – Vol. 14(1). – P. 147.
199. Reddy, H.L. Toxicity testing of a novel riboflavin-based technology for pathogen reduction and white blood cell inactivation / H.L. Reddy, A.D. Dayan, J. Cavagnaro [et al.]. – Text: immediate // Transfus Med Rev. – 2008. – Vol. 22. – P. 133-153.
200. Relhan, N. Emerging worldwide antimicrobial resistance, antibiotic stewardship and alternative intravitreal agents for the treatment of endophthalmitis / N. Relhan, A. Pathengay, S.G. Schwartz, H.W. Flynn Jr. – Text: immediate // Retina. – 2017. – Vol. 37. – № 5. – P. 811-818.
201. Results of the Endophthalmitis Vitrectomy Study. A randomized trial of immediate vitrectomy and of intravenous antibiotics for the treatment of postoperative bacterial endophthalmitis / Endophthalmitis Vitrectomy Study Group. – Text: immediate // Arch Ophthalmol. – 1995. – Vol. 113. – № 12. – P. 1479-1496.
202. Romer, P. Руководство по глазным болезням в форме клинических лекций / P. Romer. – М.: Практическая Медицина, 1913. – 222 с. – Текст: непосредственный.
203. Ruane, P.H. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light / P.H. Ruane, R. Edrich, D. Gampp [et al.]. – Text: immediate // Transfusion. – 2004. – Vol. 44. – P. 877-885.
204. Said, D.G. Collagen cross-linking with photoactivated riboflavin (PACK-CXL) for the treatment of advanced infectious keratitis with corneal melting / D.G. Said, M.S. Elalfy, Z. Gatziofas [et al.]. – Text: immediate // Ophthalmology. – 2014. – Vol. 121. – № 7. – P. 1377-1382.
205. Saini, S. Photo-activated chromophore for infectious keratitis cross-linking and its efficacy as a treatment modality in managing microbial keratitis / S.

Saini, S. Singh, K. Dwivedi [et al.]. – Text: immediate // Ind J Ophthalmol. – 2022. – Vol. 70. – № 5. – P. 1571-1577.

206. Sandhu, S.K. Mitochondrial electron transport chain complexes in aging rat brain and lymphocytes / S.K. Sandhu, G. Kaur. – Text: immediate // Biogerontol. – 2003. – Vol. 4. – № 1. – P. 19-29.

207. Savchenko, S.S. Exction-phonon interactions and temperature behavior of optical spectra in Core/Shell InP/ZnS quantrum dots / S.S. Savchenko, A.S. Vokhmintsev, I.A. Weinstein. – Text: immediate // Core/Shell Quantum Dots / Ed. by X. Tong, Z.M. Wang. – Ekaterinburg, 2020. – P. 165-196.

208. Savchenko, S.S. inhomogeneous broadening of the exciton band in optical absorption spectra of InP/ZnS nanocrystals / S.S. Savchenko, I.A. Weinstein. – Text: immediate // Nanomaterials. – 2019. – Vol. 9. – № 5. – P. 716.

209. Savchenko, S.S. Optical properties of InP/ZnS quantum dots deposited into nanoporous anodic alumina / S.S. Savchenko, A.S. Vokhmintsev, I.A. Weinstein. – Text: immediate // J Phys Conf Ser. – 2016. – Vol. 741. – № 1. – P. 012151.

210. Savchenko, S.S. Temperature-induced shift of the exciton absorption band in InP/ZnS quantum dots / S.S. Savchenko, A.S. Vokhmintsev, I.A. Weinstein. – Text: immediate // Opt Mater Express. – 2017. – Vol. 7. – № 2. – P. 354.

211. Sengupta, S. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature / S. Sengupta, M.K. Chattopadhyay, H.P. Grossart. – Text: immediate // Front Microbiol. – 2013. – Vol. 4. – P. 47.

212. Sharma, N. Outcomes of therapeutic penetrating keratoplasty from a tertiary eye care centre in northern India / N. Sharma, M. Jain, S.V. Sehra [et al.]. – Text: immediate // Cornea. – 2014. – Vol. 33(2). – P. 114-118.

213. Sharma, S. Vancomycin-resistant enterococcal endophthalmitis / S. Sharma, R.U. Desai, A.B. Pass [et al.]. – Text: immediate // Arch Ophthalmol. – 2010. – Vol. 128. – № 6. – P. 794-795.

214. Sheha, H. Sutureless amniotic membrane transplantation for severe bacterial keratitis / H. Sheha, L. Liang, J. Li, S.C. Tseng. – Text: immediate // Cornea. – 2009. – Vol. 28. – P. 1118-1123.
215. Shi, W. Perioperative treatment and prognostic factors for penetrating keratoplasty in Acanthamoeba keratitis unresponsive to medical treatment / W. Shi, M. Liu, H. Gao [et al.]. – Text: immediate // Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. – 2009. – Vol. 247. – № 10. – P. 1383-1388.
216. Singh, R.B. Efficacy of cyanoacrylate tissue adhesive in the management of corneal thinning and perforation due to microbial keratitis / R.B. Sing, S. Zhu, A. Yung [et al.]. – Text: immediate // Ocul Surf. – 2000. – Vol. 18. – № 4. – P. 795-800.
217. Siqueira, R.C. Pars plana vitrectomy and silicone oil tamponade for acute endophthalmitis treatment / R.C. Siqueira, A.D. Gil, F. Canamary [et al.]. – Text: immediate // Arq Bras Oftalmol. – 2009. – Vol. 72. – № 1. – P. 28-32.
218. Smith, M.A. Treatment of experimental methicillin-resistant staphylococcus epidermidis endophthalmitis with intravitreal vancomycin / M.A. Smith, J.A. Sorenson, F.D. Lowy. – Text: immediate // Ophthalmology. – 1986. – Vol. 93. – P. 1328-1335.
219. Spellberg, B. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America / B. Spellberg, R. Guidos, D. Gilbert [et al.]. – Text: immediate // Clin Infect Dis. – 2008. – Vol. 46. – № 2. – P. 155-164.
220. Spellberg, B. The future of antibiotics and resistance: a tribute to a career of leadership by John Bartlett / B. Spellberg, D.N. Gilbert. – Text: immediate // Clin Infect Dis. – 2014. – Vol. 59. – № 2. – P. 71-75.
221. Srinivasan, M. Steroids for Corneal Ulcers Trial Group. Corticosteroids for bacterial keratitis: the Steroids for Corneal Ulcers Trial (SCUT) / M. Srinivasan, J. Mascarenhas, R. Rajaraman [et al.]. – Text: immediate // Arch Ophthalmol. – 2012. – 130. – № 2. – Vol. 143-150.

222. Stamate, A.C. Update on surgical management of corneal ulceration and perforation / A.C. Stamate, C.P. TStaru, M. Zemba. – Text: immediate // Rom J Ophthalmol. – 2019. – Vol. 63. – № 2. – P. 166-173.
223. Stapleton, F. TFOS DEWS II epidemiology report / F. Stapleton, M. Alves, V.Y. Bunya [et al.]. – Text: immediate // Ocul Surf. – 2017. – Vol. 15. – P. 334-365.
224. Sternberg, Jr. P. Management of endophthalmitis in the post-Endophthalmitis Vitrectomy Study era / Jr.P. Sternberg, D.F. Martin. – Text: immediate // Arch Ophthalmol. – 2001. – Vol. 119. – № 5. – P. 754-755.
225. Sugar, H.S. Late infection of filtering conjunctival scars / H.S. Sugar, T. Zekman. – Text: immediate // Am J Ophthalmol. – 1958. – Vol. 46. – № 2. – P. 155-170.
226. Suwan-apichon, O. Topical corticosteroids as adjunctive therapy for bacterial keratitis / O. Suwan-apichon, J.M. Reyes, S. Herretes [et al.]. – Text: immediate // Cochrane Database of Syst Rev. – 2007. – Vol. 4. – P. 14-19.
227. Taban, M. Acute endophthalmitis following cataract surgery / M. Taban, A. Behrens, R.L. Newcomb [et al.]. – Text: immediate // Arc Ophthalmol. – 2005. – Vol. 123. – P. 613-620.
228. Takeda, A. CCR3 is a target for age-related macular degeneration diagnosis and therapy / A. Takeda, J.Z. Baffi, M.E. Kleinman [et al.]. – Text: immediate // Nature. – 2009. – Vol. 460. – № 7252. – P. 225-287.
229. Tallab, R.T. Corticosteroids as a therapy for bacterial keratitis: an evidence-based review of 'who, when and why / R.T. Tallab, D.U. Stone. – Text: immediate // Br J Ophthalmol. – 2016. – Vol. 100. – № 6. – P. 731-735.
230. Tam, A.L.C. Quantum dots trace lymphatic drainage from the mouse eye / A.L.C. Tam, N. Gupta, Z. Zhang [et al.]. – Text: immediate // Nanotechnology. – 2011. – Vol. 22. – № 42. – P. 112-118.
231. Tang, C.W. Community-acquired bleb-related endophthalmitis caused by vancomycin-resistant enterococci / C.W. Tang, C.K. Cheng, T.S. Lee. – Text: immediate // Can J Ophthalmol. – 2007. – Vol. 42. – № 3. – P. 477-478.

232. Termote, K. Epidemiology of bacterial corneal ulcers at tertiary centres in Vancouver, B.C / K. Termote, A.W. Joe, A.L. Butler [et al.]. – Text: immediate // Can J Ophthalmol. – 2018. – Vol. 53. – № 4. – P. 330-336.

233. Thomas, B.J. Aggressive surgical therapy with early vitrectomy, panretinal photocoagulation, and silicone oil tamponade for streptococcus mitis endophthalmitis / B.J. Thomas, Y. Yonekawa, A.J. Ruby, A. Capone Jr. – Text: immediate // Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina. – 2015. – Vol. 46. – № 8. – P. 893-895.

234. Ti, S.E. Therapeutic keratoplasty for advanced suppurative keratitis / S.E. Ti, S.J. Scott, P. Janardhanan, D.T.H. Tan. – Text: immediate // Am J Ophthalmol. – 2007. – Vol. 143. – № 5. – P. 755-762.

235. Ting, D.S.J. Acute corneal perforation 1 week following uncomplicated cataract surgery: the implication of undiagnosed dry eye disease and topical NSAIDs / D.S.J. Ting, S. Ghosh. – Text: immediate // Ther Adv Ophthalmol. – 2019. – Vol. 11. – P. 114-118.

236. Ting, D.S.J. Photoactivated chromophore for infectious keratitis – Corneal cross-linking (PACK-CXL): A systematic review and meta-analysis / D.S.J. Ting, C. Henein, D.G. Said, H.S. Dua. – Text: immediate // Ocul Surf. – 2019. – Vol. 17. – № 4. – P. 624-634.

237. Ting, D.S.J. Risk factors, clinical outcomes, and prognostic factors of bacterial keratitis: The Nottingham Infectious Keratitis Study / D.S.J. Ting, J. Cairns, B.P. Gopal [et al.]. – Text: immediate // Med. – 2021. – Vol. 8. – P. 15-18.

238. Tiwari, H.K. MRSA Emergence of vancomycin resistant Staphylococcus aureus (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India / H.K. Tiwari. – Text: immediate // BMC Infectious Diseases. – 2006. – Vol. 6. – P. 156.

239. Tsugita, A. Photosensitized inactivation of ribonucleic acids in the presence of riboflavin / A. Tsugita, Y. Okada, K. Uehara. – Text: immediate // Biochim Biophys Acta. – 1965. – Vol. 103. – № 2. – P. 360-363.

240. Urtti, A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery / A. Urtti. – Text: immediate // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2006. – Vol. 58. – P. 1131-1135.
241. Valko, M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol [et al.]. – Text: immediate // *Int J Biochem. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 39. – P. 44-84.
242. Viswanathan, V.K. Off-label abuse of antibiotics by bacteria / V.K. Viswanathan. – Text: immediate // *Gut Microbes.* – 2014. – Vol. 5. – № 1. – P. 3-4.
243. Von Graefe, A. Therapeutische Miscellen / A. Von Graefe. – Text: immediate // *Graefes Arch Ophthalmol.* – 1863. – Vol. 9. – P. 4252.
244. Von Graefe, A. Ueber operative Eingriffe in die tieferen Gebilde des Auges. B. Perforation von abgelösten Netzhäuten und Glaskörpermembranen / A. Von Graefe. – Text: immediate // *Arch Ophthalmol.* – 1863. – Vol. 9. – P. 85-104.
245. Von Sallmann, L. Experimental study on penicillin treatment of ectogenous infection of vitreous / L. Von Sallmann, K. Meyer, J. DiGrandi. – Text: immediate // *Arch Ophthalmol.* – 1945. – Vol. 33. – P. 179-189.
246. Von Sallmann, L. Penicillin therapy of infections of the vitreous / L. Von Sallmann. – Text: immediate // *Arch Ophthalmol.* – 1945. – Vol. 33. – P. 455-462.
247. Vote, B.J. Cyanoacrylate glue for corneal perforations: A description of a surgical technique and a review of the literature / B.J. Vote, M.J. Elder. – Text: immediate // *Clin Exp Ophthalmol.* – 2000. – Vol. 28. – P. 437-442.
248. Vranka, J.A. Mapping molecular differences and extracellular matrix gene expression in segmental outflow pathways of the human ocular trabecular meshwork / J.A. Vranka, J.M. Bradley, Y.F. Yang [et al.]. – Text: immediate // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10. – № 3. – P. 25-29.
249. Wakaki, S. Isolation of new fractions of antitumor mitomycins / S. Wakaki, H. Marumo, K. Tomioka. – Text: immediate // *Antibiot Chemother.* – 1958. – Vol. 8. – P. 228-240.

250. Walling, M.A. Quantum dots for live cell and in vivo imaging / M. A. Walling, J.A. Novak, J.R.E. Shepard. – Text: immediate // *Int J Mol Sci.* – 2009. – Vol. 10. – № 2. – P. 441-491.
251. Wang, H.C. Transplantation of quantum dot-labelled bone marrow-derived stem cells into the vitreous of mice with laser-induced retinal injury: Survival, integration and differentiation / H.C. Wang, J. Brown, H. Alayon [et al.]. – Text: immediate // *Vis Res.* – 2010. – Vol. 50. – № 7. – P.665-673.
252. Wang, Z. Clinical study of pars plana vitrectomy with silicone oil endotamponade in posttraumatic endophthalmitis on eyes without retinal detachment / Z. Wang, N. Dong, Y. Kang [et al.]. – Text: immediate // *Yan Ke Xue Bao.* – 2007. – Vol. 23. – № 1. – P. 48-52.
253. Wansapura, P.T. Preparation of chitin-CdTe quantum dots films and antibacterial effect on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* / P.T. Wansapura, R.S. Dassanayake, A. Hamood [et al.]. – Text: immediate // *J Appl Polym Sci.* – 2017. – Vol. 134. – № 22. – P. 89-93.
254. Weller, H. Quantum size colloids: From size-dependent properties of discrete particles to self-organized superstructures / H. Weller. – Text: immediate // *Curr Opin Colloid Interface Sci.* – 1998. – Vol. 3. – P. 194-199.
255. Weng, J. Highly luminescent CdTe quantum dots prepared in aqueous phase as an alternative fluorescent probe for cell imaging / J. Weng, X. Song, L. Li [et al.]. – Text: immediate // *Talanta.* – 2006. – Vol. 70. – P. 397-402.
256. West, E.S. The incidence of endophthalmitis after cataract surgery among the US Medicare population increased between 1994 and 2001 / E.S. West, A. Behrens, P.J. McDonnell [et al.]. – Text: immediate // *Ophthalmology.* – 2005. – Vol. 112. – P. 1388-1394.
257. Wilhelmus, K.R. Indecision about corticosteroids for bacterial keratitis: an evidence-based update / K.R. Wilhelmus. – Text: immediate // *Ophthalmology.* – 2002. – Vol. 109. – № 5. – P. 835-842.

258. Wollensak, G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope / G. Wollensak. – Text: immediate // *Cur Opin Ophthalmol.* – 2006. – Vol. 17(4). – P. 356-360.
259. Wollensak, G. Riboflavin/ultravioletA-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus / G. Wollensak, E. Spoerl, T. Seiler. – Text: immediate // *Am J Ophthalmol.* – 2003. – Vol. 135. – № 5. – P. 620-627.
260. Yaghini, E. Quantification of reactive oxygen species generation by photoexcitation of PEGylated quantum dots / E. Yaghini [et al.]. – Text: immediate // *Small.* – 2014. – Vol. 10. – P. 5106-5115.
261. Yamamoto, S. Visualizing vitreous using quantum dots as imaging agents / S. Yamamoto, N. Manabe, K. Fujioka [et al.]. – Text: immediate // *IEEE Trans Nanobioscience.* – 2007. – Vol. 6. – № 1. – P. 94-98.
262. Yin, J. Outcomes of Cyanoacrylate Tissue Adhesive Application in Corneal Thinning and Perforation / J. Yin, R.B. Singh, R. Al Karmi [et al.]. – Text: immediate // *Cornea.* – 2019. – Vol. 38. – № 6. – P. 668-673.
263. Zarbin, M.A. Nanomedicine in ophthalmology: the new frontier / M.A. Zarbin, M.A.C. Montemagno, J.F. Leary [et al.]. – Text: immediate // *Am J Ophthalmol.* – 2010. – Vol. 150. – № 2. – P. 144-162.
264. Zare, M. Essential role of quantum science and nanoscience in antiviral strategies for COVID-19 / M. Zare, M. Sillanpää, S. Ramakrishna. – Text: immediate // *Material Advances.* – 2021. – Vol. 2. – P. 2188-2199.
265. Zhang, J. Clinical analysis of 23-gauge vitrectomy for the treatment of acute endophthalmitis after cataract surgery / J. Zhang, F. Han, X. Zhai. – Text: immediate // *Eur J Ophthalmol.* – 2015. – Vol. 25. – № 6. – P. 503-506.
266. Zhao, P. Near-infrared dual-emission quantum dots-gold nanoclusters nanohybrid via co-template synthesis for ratiometric fluorescent detection and bioimaging of ascorbic acid In Vitro and In Vivo / P. Zhao, K. He, Y. Han [et al.]. – Text: immediate // *Anal Chem.* – 2015. – Vol. 87. – № 19. – P. 9998-10005.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБ	– антибиотик
АФК	– активная форма кислорода
БК	– бактериальный кератит
ВГД	– внутриглазное давление
Гр ⁺	– грамположительная микрофлора
Гр ⁻	– грамотрицательная микрофлора
ЗЗР	– зона задержки роста
ИВВ	– интравитреальное введение
ИВИ	– интравитреальная инъекция
КТ	– квантовая точка
ЛП	– лекарственный препарат
ЛЭЧ	– легкие эмбриона человека
МБК	– минимальная бактерицидная концентрация
мкМ	– микромоль
МЛУ	– множественная лекарственная устойчивость
МРЗС	– метициллин-резистентный золотистый стафилококк
МТТ	– тест оценки метаболической активности клеток
нМ	– наномоль
НЧ	– наночастица
ОКТ	– оптическая когерентная томография
ОП	– оптическая плотность
ОЭ	– острый эндофтальмит
ПАВ	– поверхностно-активные вещества
ПКП	– послойная кератопластика
ПО	– передний отрезок
ПЭМ	– просвечивающая электронная микроскопия
СКП	– сквозная кератопластика
СМ	– силиконовое масло

СЭМ/РЭМ – сканирующая/растровая электронная микроскопия
ТПГГ – территориальная программа государственных гарантий
УЗИ – ультразвуковое исследование (сонография)
ФЛ – флуоресценция
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)
MRSA - methicillin-resistant Staphylococcus aureus
Ох – окислитель
рН – водородный показатель
PTFE – политетрафторэтилен
Red – восстановитель

ПАСПОРТ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ЛЭЧ-4(81)

Видовое название штамма: ЛЭЧ

Регистрационный номер: 399/1/2/9 20

Авторское название: ЛЭЧ-4(81)

Родословная: получена из нормальной ткани легкого эмбриона человека в лаборатории клеточных культур ЕНИИВИ Н.П. Глинских с соавторами в 1981 году из легких 12-недельного эмбриона человека, от здоровой женщины, не имеющей в генеалогии злокачественных или наследственных заболеваний (Авт.свид. 3545014/28-13).

Число генераций и пассажей: до начала анализа прошла не более 20 пассажей.

Стандартные условия выращивания:

Среда роста: Среда Игла МЕМ + среда ГЛА+10% эмбриональная телячья

Среда поддержания: То же без сыворотки.

Способ посева: 1:2. Снятие с пластика 0,02% раствором Версена или трипсином ЭДТА.

Культуральные свойства: доза посадки на матрасы 140-160 тыс./мл

Монослой образуется на 4-5 сутки с момента посадки.

Морфологические характеристики: клетки фибробластоподобного типа с четкими границами.

Кариологическая характеристика: По структуре кариотипа клетки соответствуют кариотипу человека. Модальный класс содержит 87% клеток с нормальным диплоидным набором хромосом человека.

Видовая принадлежность: человек, подтверждено кариологически, изоэнзимным методом.

Сведения о контаминации: бактерий, грибов, микоплазм не выявлено.

Сведения о криоконсервации: сохраняется в среде роста + 5% ДМСО в жидком азоте. При размораживании восстанавливается 70% клеток.

Чувствительность к вирусам: культура высоко чувствительна к полиовирусам 1,2,3 типов, Коксаки В3, ЕСНО 3,6,11,13,19,20,24,28, РС-вирусам, вирусу простого герпеса.