

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА С ВОРИКОНАЗОЛОМ В ГИДРОГЕЛЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГРИБКОВОГО КЕРАТИТА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА

- ^{1,2}Бойко Э. В. ORCID ID 0000-0002-7413-7478,
¹Щемеров Н. В. ORCID ID 0000-0002-9874-6665,
¹Трунин Е. М. ORCID ID 0000-0002-2452-0321,
^{1,3}Пономаренко Г. Н. ORCID ID 0000-0001-7853-4473,
¹Забродская Ю. М. ORCID ID 0000-0001-6206-2133,
⁴Васильева Н. В. ORCID ID 0000-0003-3693-5468,
^{1,3}Кустова О. В. ORCID ID 0009-0007-1408-7492,
¹Татаркин В. В. ORCID ID 0000-0002-9599-3935,
⁴Босак И. А. ORCID ID 0000-0002-0193-9103,
¹Стрельникова Е. Г. ORCID ID 0000-0002-1208-8092,
^{1,5}Чухно А. С. ORCID ID 0009-0008-1520-1450,
²Титов А. В. ORCID ID 0000-0001-6847-4737,
⁵Шерстнев В. В. ORCID ID 0009-0007-8898-3206,
¹Гришин П. П. ORCID ID 0009-0004-3871-5324

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация, e-mail: shemerovvv@gmail.com;

²Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С. Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербургский филиал, Санкт-Петербург, Российская Федерация;

³Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-образовательный центр медико-социальной экспертизы и реабилитации имени Г. А. Альбрехта» Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация;

⁴Научно-исследовательский институт медицинской микологии имени П. Н. Кашкина федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация;

⁵Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Одной из основных проблем в лечении грибкового кератита является отсутствие одобренных офтальмологических форм противогрибковых препаратов, что вынуждает использовать лекарственные средства вне инструкции и сопровождается непредсказуемостью в отношении эффективности и безопасности. Недостаточная проникающая способность препаратов, используемых для местного применения, ограничивает их терапевтическую значимость. Одним из перспективных способов повышения эффективности лечения может стать ванночковый электрофорез. Цель исследования – оценить эффективность местного применения ванночкового электрофореза с вориконазолом в гидрогеле модифицированного сывороточного альбумина (МБСА) для лечения грибкового кератита в условиях эксперимента. Было проведено этапное экспериментальное исследование, которое включало физико-химическое изучение гидрогеля на основе МБСА в качестве транспортной среды. На втором этапе проводили оценку концентрации вориконазола в тканях роговицы кадаверных глаз при использовании электрофореза по сравнению с простыми инстилляциями. На третьем этапе было проведено исследование *in vivo* на животной модели. Эффективность оценивали с использованием клинических методов исследования, оптической когерентной томографии и гистологического анализа тканей роговицы. Установлено, что гидрогель на основе МБСА способен специфически связывать молекулы вориконазола и увеличивать их подвижность под действием электрического поля. Хроматографический анализ показал увеличение концентрации вориконазола в ткани при использовании электрофореза по сравнению с инстилляциями. В условиях животной модели оба метода лечения способствовали снижению клинических признаков воспаления. При проведении оптической когерентной томографии различий между методами

выявлено не было. Однако гистологическое исследование показало уменьшение степени инфильтрации в роговице при электрофорезе вориконазола по сравнению с инстилляциями. Введение раствора вориконазола в гидрогеле МБСА с использованием ванночкового электрофореза способствует увеличению концентрации препарата в ткани роговицы и обеспечивает выраженное противогрибковое действие.

Ключевые слова: грибковый кератит, офтальмомикоз, кератомикоз, вориконазол, сывороточный альбумин, гидрогель, электрофорез.

***Благодарности:** Авторы выражают благодарность коллективу кафедры оперативной и клинической хирургии с топографической анатомией имени С. А. Симбирцева, а также участникам студенческого научного общества за активный вклад в проведение экспериментального исследования.*

EFFICACY OF IONTOPHORESIS WITH VORICONAZOLE IN MODIFIED SERUM ALBUMIN HYDROGEL FOR THE TREATMENT OF FUNGAL KERATITIS IN AN EXPERIMENTAL SETTING

^{1,2}Boyko E. V. ORCID ID 0000-0002-7413-7478,
¹Schemerov N. V. ORCID ID 0000-0002-9874-6665,
¹Trunin E. M. ORCID ID 0000-0002-2452-0321,
^{1,3}Ponomarenko G. N. ORCID ID 0000-0001-7853-4473,
¹Zabrodsкая Yu. M. ORCID ID 0000-0001-6206-2133,
⁴Vasileva N. V. ORCID ID 0000-0003-3693-5468,
^{1,3}Kustova O. V. ORCID ID 0009-0007-1408-7492,
¹Tatarkin V. V. ORCID ID 0000-0002-9599-3935,
⁴Bosak I. A. ORCID ID 0000-0002-0193-9103,
¹Strelnikova E. G. ORCID ID 0000-0002-1208-8092,
^{1,5}Chukhno A. S. ORCID ID 0009-0008-1520-1450,
²Titov A. V. ORCID ID 0000-0001-6847-4737,
⁵Sherstnev V. V. ORCID ID 0009-0007-8898-3206,
¹Grishin P. P. ORCID ID 0009-0004-3871-5324

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education
“North-West State Medical University named after I. I. Mechnikov” of the Ministry of Health of the Russian
Federation, Saint Petersburg, Russian Federation, e-mail: shemerovvv@gmail.com;

²Federal State Autonomous Institution “National Medical Research Center Intersectoral Scientific and Technical
Complex “Eye Microsurgery” named after Academician S. N. Fedorov” of the Ministry of Health of the Russian
Federation, Saint Petersburg Branch, Saint Petersburg, Russian Federation;

³Federal State Budgetary Institution “Federal Scientific and Educational Center for
Medical and Social Expertise and Rehabilitation named after G. A. Albrecht” of the Ministry of Labor and Social
Protection of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russian Federation;

⁴Research Institute of Medical Mycology named after P. N. Kashkin of the Federal State Budgetary Educational
Institution of Higher Education “North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov” of the Ministry
of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russian Federation;

⁵Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education
“Saint Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University” of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Saint Petersburg, Russian Federation

One of the primary challenges in the treatment of fungal keratitis is the absence of approved ophthalmic formulations of antifungal agents, which necessitates their off-label use and is associated with unpredictable efficacy and safety profiles. Insufficient corneal penetration of topically applied agents limits their therapeutic value. Ocular bath iontophoresis represents a promising approach to enhancing treatment efficacy. Objective: to evaluate the efficacy of topical ocular bath iontophoresis with voriconazole in modified bovine serum albumin (MBSA) hydrogel for the treatment of fungal keratitis in an experimental model. A multi-stage experimental study was conducted, comprising physicochemical characterization of MBSA-based hydrogel as a drug delivery vehicle. In the second stage, voriconazole concentrations in corneal tissue of cadaveric eyes were assessed following iontophoresis compared with conventional instillation. The third stage involved an *in vivo* study using an animal model. Efficacy was evaluated by clinical examination, optical coherence tomography (OCT), and histological analysis of corneal tissue. MBSA-based hydrogel was found to specifically bind voriconazole molecules and

enhance their mobility under the influence of an electric field. Chromatographic analysis demonstrated increased voriconazole tissue concentrations following iontophoresis compared with instillation. In the animal model, both treatment modalities contributed to a reduction in clinical signs of inflammation. No differences between the methods were identified on OCT. However, histological examination revealed a reduction in the degree of corneal infiltration with voriconazole iontophoresis compared with instillation. Administration of voriconazole in MBSA hydrogel via ocular bath iontophoresis promotes increased drug concentration in corneal tissue and provides pronounced antifungal activity.

Keywords: fungal keratitis, ophthalmomycosis, keratomycosis, voriconazole, serum albumin, hydrogel, iontophoresis.

***Acknowledgements:** The authors express their gratitude to the staff of the S. A. Simbirtsev Department of Operative and Clinical Surgery with Topographic Anatomy, as well as to the members of the student scientific society for their active contribution to the experimental study.*

Введение

Грибковый кератит – тяжелая инфекционная патология роговицы. Ее доля в структуре всех инфекционных кератитов может составлять от 1 до 60 % в зависимости от таких условий, как климат региона, уровень урбанизации и структура экономики страны [1]. При этом доля неблагоприятных исходов может составлять до 28 % случаев [2], а процент тяжелых осложнений, включающих перфорацию роговицы, эндофтальмит и панофтальмит, являющихся причиной энуклеации и эвисцерации, составляет от 15 до 30 % [3, 4].

Одной из причин низкой эффективности консервативного лечения грибкового кератита является отсутствие официальных офтальмологических форм противогрибковых лекарственных средств в большинстве стран, в том числе в России. Вследствие этого врачи вынуждены использовать иные формы препаратов в режиме off-label, что сопровождается высокой вариабельностью эффективности и безопасности, особенно при выборе некорректной концентрации, частоты применения или отсутствии хорошей проникающей способности лекарственного вещества [5].

Относительно высокой проникающей способностью в ткани роговицы обладают лекарственные препараты из класса азолов (флуконазол, вориконазол). При этом вориконазол также имеет такие положительные свойства, как широкий спектр противогрибкового действия и высокая способность к проникновению в строму роговицы и в переднюю камеру глаза, что обусловлено относительно низкой молекулярной массой и хорошей растворимостью при использовании классической формы лиофилизата в комплексе с циклодекстрином. Однако данное свойство реализуется лишь при частых закапываниях препарата, а также может быть ограничено за счет частого моргания, обильного слезоотделения, наличия плотного инфильтрата, густого отделяемого, а также воспалительного отека роговицы, в особенности при длительном и осложненном воспалительном процессе [5, 6].

Доказано, что использование для местного применения раствора вориконазола в концентрации более чем 1 % нецелесообразно, так как не ведет к значимому повышению

концентрации в тканях роговицы, в связи с чем актуальной задачей является поиск иных путей повышения эффективности накопления лекарственного средства в роговице [7, 8].

Одним из эффективных способов усиления накопления лекарственного препарата в строме является ванночковый электрофорез. Ранее предпринимались попытки применения электрофореза вориконазола в виде раствора комплекса с циклодекстрином и в транспортной капсуле липосом, что, однако, не нашло широкого применения [9, 10].

Одним из вариантов транспортной среды при электрофорезе вориконазола может быть биополимерный гидрогель на основе модифицированного альбумина. Механизм действия его основан на заключении молекул лекарственного средства в структуру длинной глобулярной молекулы альбумина и ускорении их совокупной подвижности под действием электрического тока. При этом процесс синтеза подобного гидрогеля является относительно легким и малозатратным [11, 12].

Сывороточный альбумин, используемый в качестве транспортной среды, обладает рядом преимуществ, в том числе высокой биосовместимостью и возможностью биodeградации. При этом он является удобным инструментом для применения в медицине за счет возможности изменения объема и вязкости под действием таких внешних факторов, как температура, pH, ионный состав среды [12].

Цель исследования – оценить эффективность местного применения ванночкового электрофореза с вориконазолом в альбуминовом гидрогеле для лечения грибкового кератита в условиях эксперимента.

Материал и методы исследования

Этап 1: исследование возможности применения гидрогеля модифицированного бычьего сывороточного альбумина (МБСА) в качестве транспортной среды для молекул вориконазола.

Исследование физико-химических свойств МБСА проводили на базе кафедры клинической лабораторной диагностики, биологической и общей химии им. В. В. Соколовского ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова, а также кафедры физической и неорганической химии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России.

Синтез биополимерного гидрогеля проводили по технологии, разработанной авторами [13]. В работе были использованы: бычий сывороточный альбумин (БСА), (BSA – Product number A2153, Fraction V, Sigma – Aldrich Company Ltd, Gillingham, UK). Растворы БСА получали путем растворения лиофилизированного белка в растворе. Раствор этанола (40 %), ацетилцистеин ($\geq 99,5$ %).

Все использованные в работе реактивы соответствовали марке «чистый для анализа». Все растворы готовились на бидистиллированной воде. Концентрированные растворы

готовились по точной навеске, растворы HCl и KCl готовились из фиксаналов, разбавленные – методом последовательного разведения.

Навеску БСА растворяли в 100 мл раствора ацетилцистеина (дистиллированной воды с добавлением точной навески ацетилцистеина), перемешивание осуществлялось с помощью магнитной мешалки до полного растворения. Полученный раствор сливали в фарфоровую чашу, прогревали и упаривали на 50 % по объему. К упаренному раствору БСА добавляли водный 40 %-ный раствор этанола (100 мл) и перемешивали. Затем повторно упаривали до необходимой концентрации до полного удаления из смеси спирта.

Электрокинетический потенциал (ζ -потенциал) определяли методом макроэлектрофореза – методом подвижной границы на приборе Чайковского – Малаховой [14]. Границу раздела между водной дисперсией белка и раствором, имеющим такой же состав, как и дисперсионная среда, определяли с помощью лазера [15]. Для макроэлектрофореза использовали раствор модифицированного БСА. Электрокинетический потенциал белков рассчитывали по уравнению Гельмгольца – Смолуховского. Погрешность всех измерений не превышала 10 %.

Этап 2: определение возможности повышения концентрации вориконазола в ткани роговицы при помощи электрофореза в транспортной среде МБСА (исследование *ex vivo*)

С целью определения принципиальной возможности усиления накопления тканями роговицы частиц вориконазола путем электрофореза в среде МБСА на базе научно-исследовательской лаборатории хроматографии СЗГМУ им. И. И. Мечникова был проведен хроматографический анализ с определением концентрации вориконазола методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖК).

Для этого предварительно были подготовлены образцы роговицы. Исследование проводили с использованием кадаверных глаз, добытых в срок не более 2 ч с момента смерти животного.

Глаза были разделены на две группы (по 6 глаз в каждой) в зависимости от способа введения вориконазола:

Группа 1 (опыт) – ванночковый электрофорез с раствором 1,0 % вориконазола в гидрогеле МБСА.

Группа 2 (контроль) – форсированные инстилляции 1,0 % раствора вориконазола – 6 раз в течение 1 ч.

Ванночковый электрофорез проводили по стандартной методике при помощи аппарата физиотерапевтического «ЭЛФОР ПРОФ» («Невотон», г. Санкт-Петербург). Положительный электрод (анод) подключали к металлическому стержню ванночки, внутрь которой помещали гидрогель МБСА, нагруженный вориконазолом в концентрации 1,0 %. Отрицательный

электрод (катод) помещался на область склеры у места выхода зрительного нерва. Длительность процедуры электрофореза составляла 10 мин, сила тока – 1,0 мА.

Затем роговицы выкраивали по краю лимба и помещали в стерильную емкость с физиологическим раствором. Образцы передавали в лабораторию хроматографии для исследования.

Для проведения хроматографического исследования использовался стандарт вориконазола (VETRANAL™, США). Рабочий раствор лекарственного препарата составлял 1 мг/мл. Для построения калибровочной зависимости по методу абсолютной градуировки использовался раствор вориконазола с концентрациями: 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,1; 1; 5; 10; 20; 50; 100 мкг/мл (рабочий раствор последовательно разбавлялся бидистиллированной водой в необходимое количество раз), $r^2 = 0,999$. Предел количественного определения вориконазола составил 5 нг/мл. Для проведения пробоподготовки и хроматографического исследования использовались следующие реактивы: ацетонитрил («Вектон», Россия), хлороформ («Экос», Россия).

Хроматографический анализ выполняли на жидкостном хроматографе Agilent Technologies 1260 Infinity с диодно-матричным детектором. Условия проведения анализа: колонка Phenomenex Luna C18 (2), 150x2,00 мм, 5 мкм при температуре 26 °С и предколонка Phenomenex SecurityGuard с картриджами C18 4x2,0 мм, 10/Рк. В качестве подвижной фазы в режиме градиентного элюирования использовали смесь ацетонитрила в бидистиллированной воде (от 25 до 80 % ацетонитрила). Скорость потока подвижной фазы – 0,3 мл/мин. Объем вводимой пробы – 20 мкл. Время хроматографирования: 22 мин. УФ-детектирование проводили при длине волны $254 \pm 1,2$ нм.

Исследование включало анализ роговиц глаз кроликов (ткани) после воздействия вориконазола, а также физраствора (3 мл), в который они были помещены. Подготовка реальных образцов к анализу включала в себя экстракцию вориконазола хлороформом и упаривание органического слоя в токе воздуха до сухого остатка. Полученный сухой остаток растворяли в 60 мкл подвижной фазы и переносили в микровиалы для ВЭЖХ для последующего анализа.

Этап 3: оценка эффективности электрофореза вориконазола в гидрогеле МБСА в экспериментальных условиях *in vivo*.

С целью воспроизведения экспериментальной модели грибкового кератита были сформированы группы из лабораторных животных – кроликов породы шиншилла. В качестве одной из самых надежных и воспроизводимых была выбрана модель А. Н. Самойлова и Н. И. Давлетшиной [16, 17].

Все опыты на животных были проведены при одобрении локального этического комитета университета (заседания № 10 от 11.10.2023) в соответствии с GLP и правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей. С целью минимизации неприятных ощущений все животные предварительно были введены в состояние нейролептанальгезии (ксилазина гидрохлорид в расчете – 10 мг × 1 кг веса) и дополнительной эпibuльбарной анестезии инстилляциями оксибупрокаина (0,4 %).

После предварительной стерилизации поверхности глаза при помощи 5 % спиртового раствора формалина и лабораторного подтверждения стерильности в течение трех дней проводили закапывание раствора дексаметазона (0,1 %) 4 раза в сутки, после чего производили интрастромальное введение 5-суточной питательной среды Сабуро с культурой грибов *Fusarium solani*, гомогенизированной и смешанной с изотоническим раствором хлорида натрия. Подготовка грибковых изолятов и культуральное исследование были проведены на базе НИИ медицинской микологии им. П. Н. Кашкина.

Заражение производили с дополнительным закапыванием концентрата димексида (99 %) с целью повышения адгезивных свойств грибковых клеток. В результате 4–5-кратного повторения процедуры заражения с интервалом в 1 день удавалось добиться отчетливой клинической картины грибкового кератита, подтвержденного данными клинического и культурального исследования. Выраженность воспалительной реакции оценивали при помощи щелевой лампы с возможностью фотофиксации и описывали с использованием шкалы раздражения слизистой глаза по степени гиперемии, отека и выраженности отделяемого по балльной системе A. Majda и K. Chuscielska (табл. 1).

Таблица 1

Оценка повреждающего действия химических веществ
на слизистые оболочки глаза кролика по A. Majda и K. Chrusaielska

Признак	Баллы	Характеристика
Гиперемия конъюнктивы и роговицы	1	Сосуды инъецированы
	2	Отдельные сосуды трудно различимы
	3	Диффузное глубокое покраснение
Отек век	1	Слабый отек
	2	Выраженный отек с частичным выворачиванием век
	3	В результате отека глаз закрыт наполовину

	4	В результате отека глаз закрыт больше чем наполовину
Выделения	1	Минимальное количество в углу глаза
	2	Количество выделений увлажняет веки
	3	Количество выделений увлажняет веки и окружающую кожу

Примечание: составлена авторами по Методическим указаниям к постановке исследований по изучению раздражающих свойств и обоснованию предельно допустимых концентраций избирательно действующих раздражающих веществ в воздухе рабочей зоны (утв. заместителем Главного государственного санитарного врача СССР 11 августа 1980 г. № 2196-80)

После подтверждения наличия кератомикоза путем культурального исследования приступали к этапу лечения. Местное лечение производили на правом (опытном) глазу, в левый глаз (контрольный) закапывали стерильный физиологический раствор.

Животные были разделены на две основные серии по 6 особей в каждой:
1 серия: инстилляцией вориконазола – 10 мг/мл (ВКЗ) с частотой 6 раз в сутки;
2 серия: ванночковый электрофорез вориконазола – 10 мг/мл 1 раз в сутки.

Динамику клинических проявлений и эффективность местной терапии оценивали при помощи прижизненной оптической когерентной томографии (далее – ОКТ). Морфологическую структуру роговицы исследовали путем анализа гистологических срезов роговицы после выведения животных из эксперимента.

ОКТ-исследование

С целью оценки эффективности лечения прижизненное ОКТ-исследование было проведено в четырех временных точках: перед формированием грибкового кератита (здоровый глаз), затем на 1, 4 и 8-е сутки после начала лечения. Для объективизации исследования оценивали динамику изменения площади ОКТ-среза роговицы в определенный день по сравнению ее площадью перед началом лечения в том же месте на здоровом глазу. Используемый показатель обозначали, как коэффициент изменения площади ОКТ-среза роговицы.

Измерение площади на ОКТ-снимках в пределах диаметра в 8 мм с захватом области инфильтрата или язвы проводили при помощи программного обеспечения Adobe Acrobat Reader (рис. 1) с учетом поправок для перевода расчетов в мм². Затем показатели сравнивали с площадью на том же участке до формирования грибкового кератита (рис. 2).

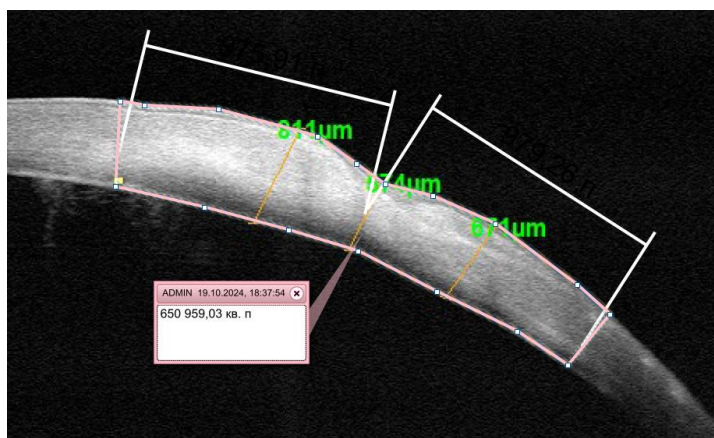


Рис. 1. Площадь ОКТ-среза роговицы в ограниченном диаметре с захватом инфильтрата.

Примечание: составлен авторами по результатам данного исследования

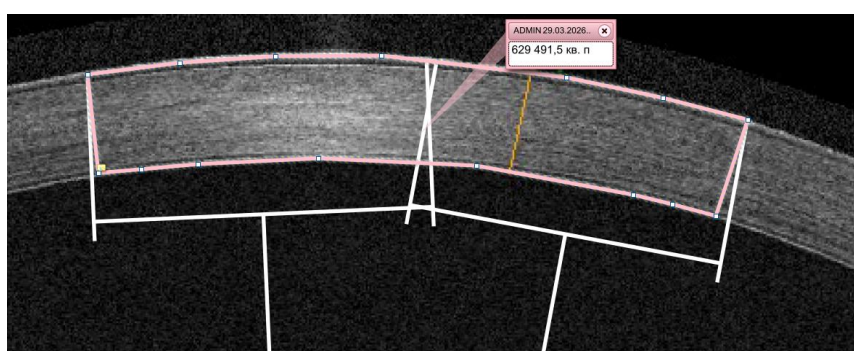


Рис. 2. Площадь ОКТ-среза в области будущего инфильтрата на интактной роговице.

Примечание: составлен авторами по результатам данного исследования

При помощи полученных данных вычисляли отношение площади ОКТ-среза пораженной стромы к ее площади на том же участке до заражения, которое использовали в дальнейшем статистическом сравнении (рис. 3).

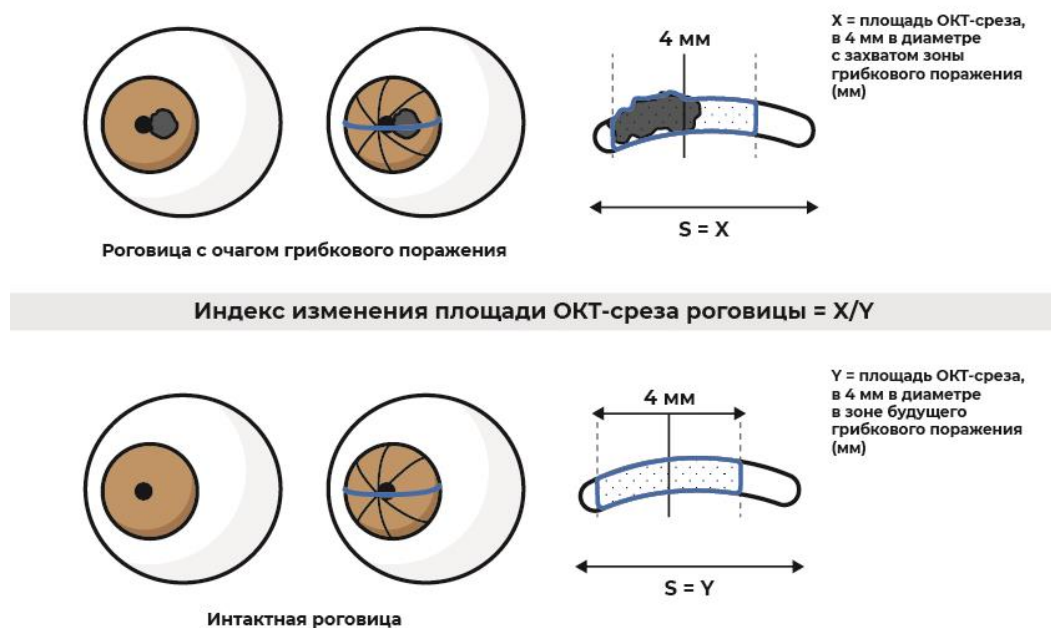


Рис. 3. Схема расчета индекса изменения площади ОКТ-среза роговицы.

Примечание: составлен авторами по результатам данного исследования

Гистологическое исследование

На 8-е сутки после выведения животных из эксперимента производили энуклеацию глазного яблока и вырезку корнеосклеральных лоскутов с захватом 3–4 мм склеры. Патоморфологическое исследование производили на кафедре патологической анатомии СЗГМУ им. И. И. Мечникова.

После фиксации в забуференном растворе 10 % нейтрального формалина выполняли ручную проводку со спиртами возрастающей концентрации, осуществляли вырезку линейного участка ткани роговицы с центром грибкового инфильтрата. Материалы заливали в парафиновые блоки, из которых формировали срезы толщиной 3 мкм окрашивали гематоксилином и эозином по стандартным гистотехническим протоколам. Морфометрическое исследование проводили с использованием программного обеспечения Aperio AT2 (Leica Biosystems, Германия). Оценивали два основных показателя: толщину эпителия роговицы и степень инфильтрации стромы.

С целью усреднения показателя толщины эпителия измерения проводили во множестве точек на всем протяжении среда роговицы с интервалом 200 мкм (рис. 4).

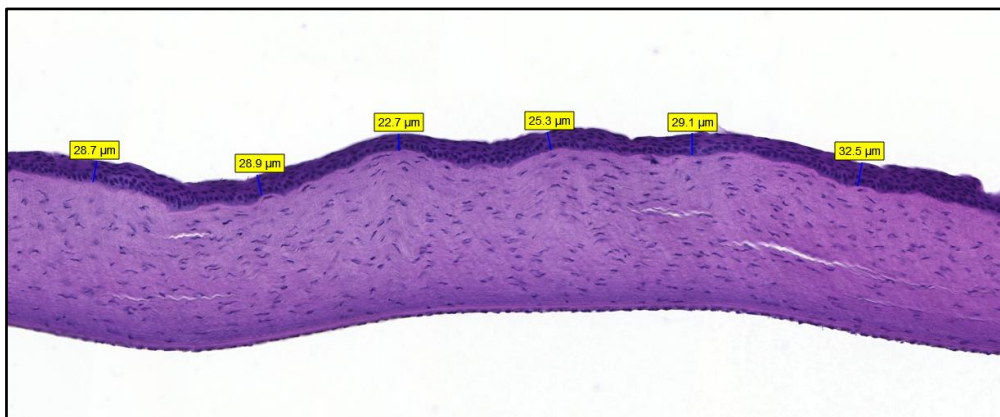


Рис. 4. Морфометрическая оценка толщины эпителия роговицы. Показан принцип проведения линейных измерений через равные интервалы по всей протяженности среза.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 200$.

Примечание: составлен авторами по результатам данного исследования

С целью объективной оценки инфильтрации роговицы производили фотофиксацию гистологических срезов при увеличении $\times 400$ в семи зонах стромы, расположенных на равном расстоянии друг от друга.

Изображения анализировали при помощи стандартного пакета Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Inc., США) с оценкой соотношения пикселей для элементов с цветом, характерным для базофильной окраски (ядра клеток, в том числе иммунных, детрит, грибковые клеточные структуры) относительно остального изображения с получением результата в числовых значениях (рис. 5).

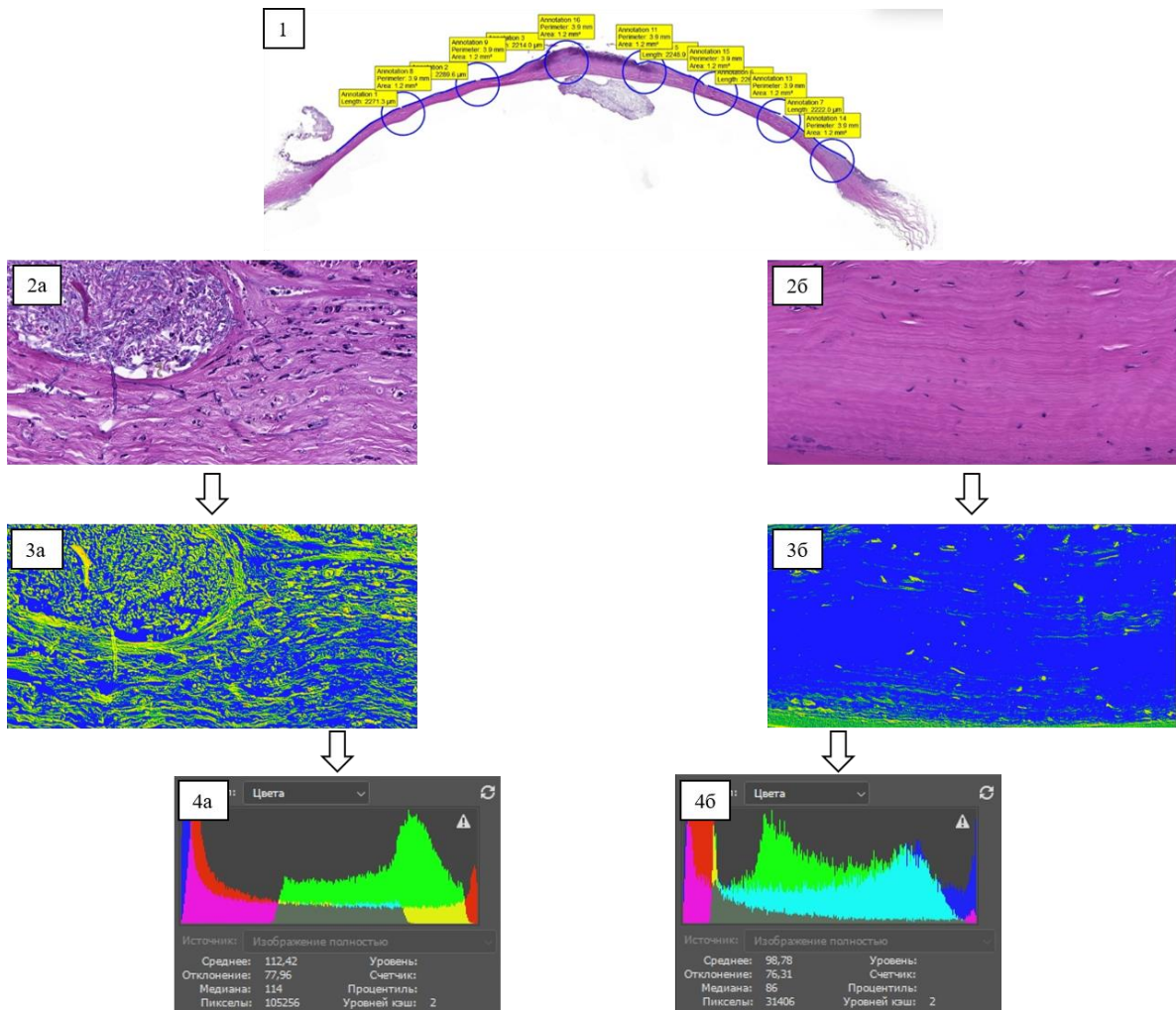


Рис. 5. Поэтапная схема оценки доли инфильтрации в ткани роговицы:

1 – панорамное сканирование среза роговицы с маркировкой зон интереса;

2 – микрофотографии выбранных зон ($\times 400$): а) участок с низкой плотностью инфильтрации, б) участок с высокой плотностью инфильтрации;

3 – выравнивание контрастных цветов по унифицированным параметрам для каждого скана; 4 – подсчет пикселей цветов, соответствующих окраске гематоксилином (зеленый, красный, желтый – ядра воспалительных клеток, тканевой детрит, ядра грибковых клеток, ядра кератоцитов) относительно всех пикселей на изображении, включая синий (коллагеновые волокна). Окраска гематоксилином и эозином.

Примечание: составлен авторами по результатам данного исследования

Статистический анализ

Статистический анализ проводили при помощи системы “Statistica for Windows”. Количественные данные проверяли на наличие нормальности распределения по критерию Шапиро – Уилка. При ненормальном распределении были применены непараметрические

критерии для малых выборок с помощью медианы (Me) и нижнего / верхнего квартилей (Q1–Q3). Для сравнения зависимых выборок расчет производили при помощи теста знаков, при независимых – при помощи U-критерия Манна – Уитни. Различие считалось значимым при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Этап 1

Обнаружено, что добавление к гидрогелю МБСА лекарственного средства (вориконазол) влияет на изменение положения точки нулевого заряда, в результате чего на графиках наблюдаются заметные отклонения и сдвиг изоэлектрической точки (для белка ИЭТ+ТНЗ), что говорит о специфическом взаимодействии, сорбционной природы (рис. 6). Это позволяет сделать предположение о возможности использования данного гидрогеля в качестве носителя данного препарата.

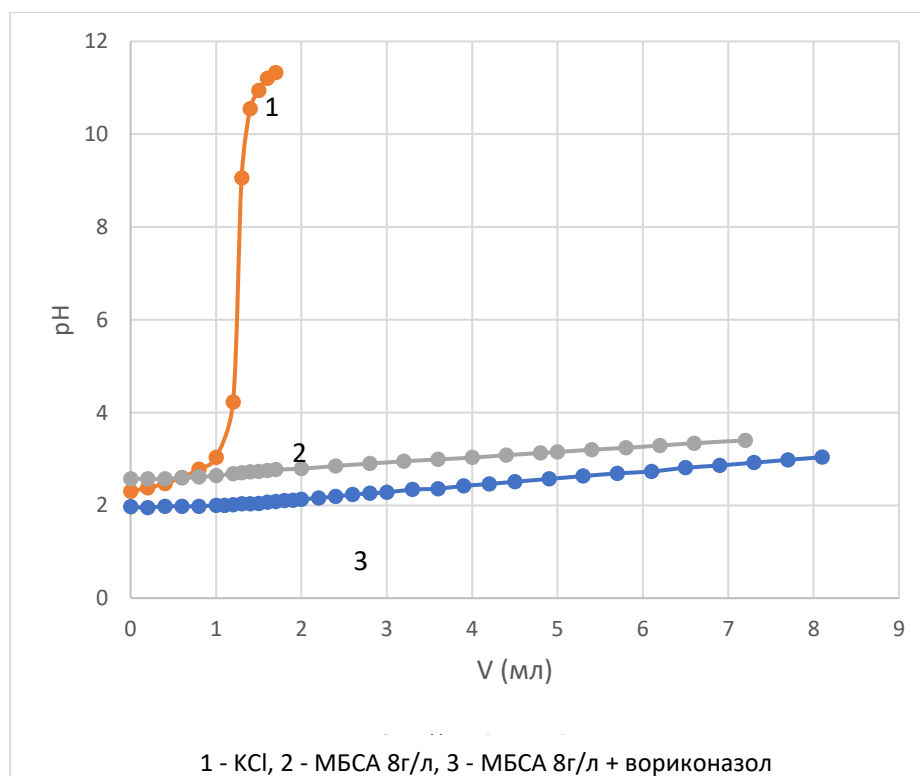


Рис. 6. Графики потенциометрического титрования: 1 – кривая титрования раствора KCl, 2 – кривая титрования раствора модифицированного БСА с концентрацией 8 г/л; 3 – кривая титрования раствора модифицированного БСА с концентрацией 8 г/л с нагрузкой вориконазолом в концентрации 10 мг/мл.

Примечание: составлен авторами по результатам данного исследования

Этап 2

В результате хроматографического анализа было выявлено значимое повышение концентрации вориконазола в серии опытных глаз по сравнению с контрольными как при сравнении концентрации в тканях роговицы, так и в физиологическом растворе, в который они были помещены (табл. 2).

Таблица 2

Результаты хроматографического анализа

Группа измерений	N	Концентрация вориконазола (мкг/мл)		P
		Медиана	Q1–Q3	
Электрофорез (концентрация в физиологическом растворе)	6	50,10	[44,30; 53,70]	< 0,05
Инстилляций (концентрация в физиологическом растворе)	6	12,55	[11,00; 14,70]	
Электрофорез (концентрация в ткани)	6	12,85	[12,10; 14,00]	< 0,05
Инстилляций (концентрация в ткани)	6	3,05	[2,70; 3,30]	

Примечание: составлена авторами на основе полученных данных в ходе исследования

Этап 3

Моделирование кератита

На 7–9-й день от начала формирования модели отчетливая клиническая картина грибкового кератита наблюдалась у всех лабораторных животных. Суммарные признаки раздражения глазной поверхности находились в диапазоне от 4,6 до 7,8 баллов (табл. 3).

Таблица 3

Суммарные показатели раздражения глазной поверхности

Группа	Глаз	Суммарный средний балл		
		1 день	4 день	8 день
Группа 1: ВКЗ	OD	6,67	7,0	4,67
	OS	6,67	7,0	5,16
Группа 2: ЭФ	OD	6,0	7,83	5,67
	OS	4,67	6,67	6,33

Примечание: составлена авторами на основе полученных данных в ходе исследования

Оценка ОКТ-критериев

При оценке индекса изменения площади ОКТ-среза роговицы значимая разница между опытными и контрольными глазами была обнаружена лишь на 8-е сутки лечения. При этом и в группе инстилляций вориконазола, и в группе электрофореза индекс на опытных глазах: 1,73 [1,31; 1,96] для инстилляций и 1,52 [1,40; 2,06] для электрофореза был значимо ближе к нормальному значению, чем в контрольных 2,36 [1,99; 3,38] для инстилляций и 2,51 [1,96; 2,96] для электрофореза ($p < 0,05$). Однако между опытными глазами в двух сериях значимой разницы обнаружено не было ($p > 0,05$) (рис. 7).

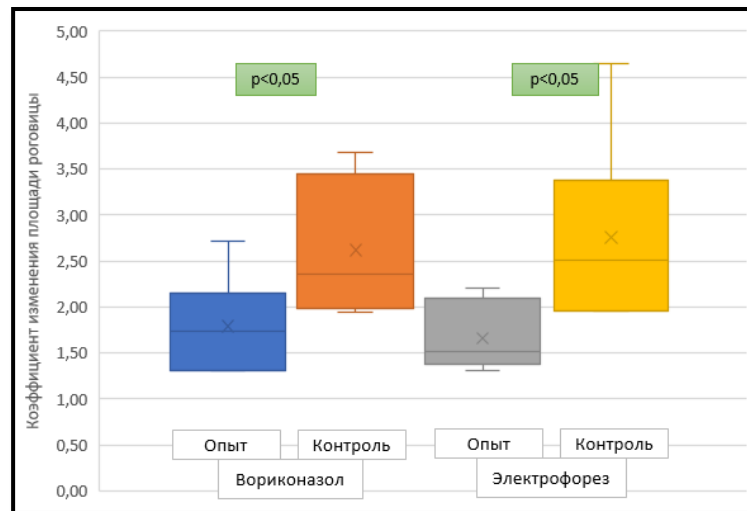


Рис. 7. Коэффициент изменения площади роговицы на 8-е сутки.

Примечание: составлен авторами по результатам данного исследования

Толщина эпителия

В обеих экспериментальных сериях толщина эпителия роговицы опытной группы была больше по сравнению с контрольными: 28,86 мкм [20,94; 37,26] против 20,31 мкм [16,35; 27,29] в серии инстилляций вориконазола и 20,65 мкм [13,01; 29,09] против 9,65 мкм [4,01; 22,47] в серии электрофореза. Однако при сравнении двух экспериментальных серий в опытной группе толщина эпителия роговицы была больше при использовании инстилляций, чем при применении электрофореза ($p < 0,05$) (рис. 8).

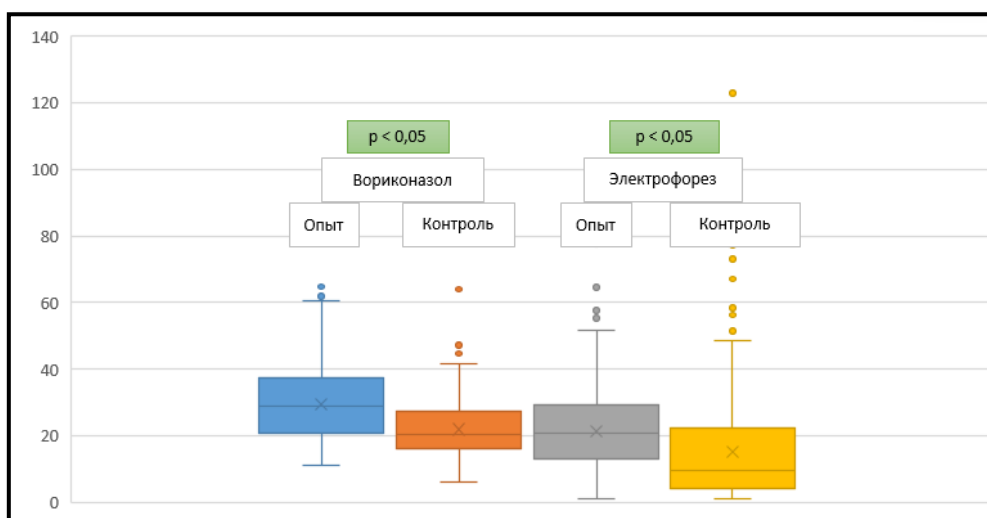


Рис. 8. Толщина эпителия (мкм) на 8-й день лечения.

Примечание: составлен авторами по результатам данного исследования

Степень инфильтрации

При измерении выраженности инфильтрации в обеих сериях лабораторных животных было выявлено уменьшение доли инфильтрированной стромы роговицы глаз кроликов опытной группы по сравнению с контрольными: 6,52 % [3,37; 16,69] против 9,37 % [5,81; 25,69] в серии инстилляций вориконазола и 2,17 % [1,54; 10,82] против 8,18 % [2,74; 19,28] в серии электрофореза. При этом при сравнении глаз в опытной группе между сериями достоверно меньшая доля инфильтрации была выявлена при применении электрофореза (рис. 9).

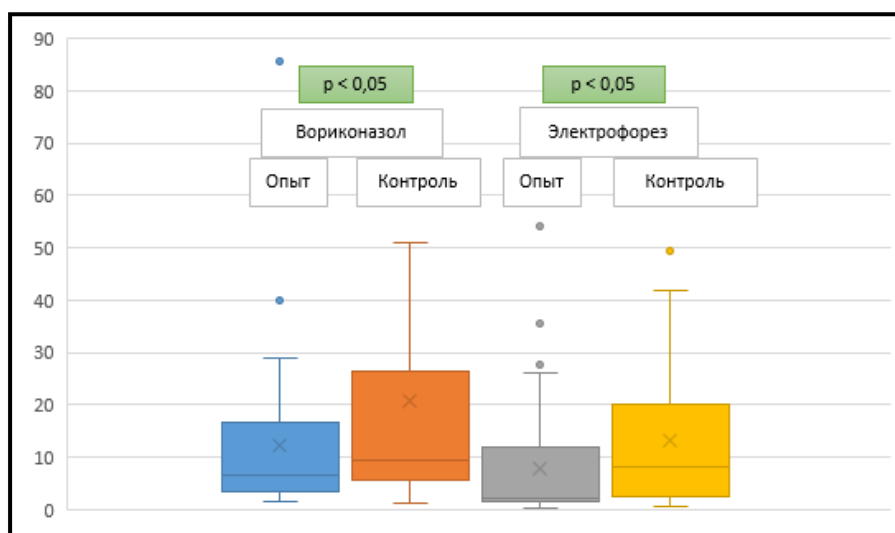


Рис. 9. Инфильтрация стромы роговицы (%) на 8-й день лечения.

Примечание: составлен авторами по результатам данного исследования

Электrofизические свойства вориконазола в гидрогеле МБСА

В рамках исследования было показано, что коллоидный гидрогель модифицированного бычьего сывороточного альбумина может служить транспортной средой для вориконазола, способствуя повышению его проникающей способности. Данное свойство, вероятно, обеспечивается наличием заряженных групп в полимерной молекуле альбумина, способствующим захвату молекул лекарственных препаратов, что подтверждено результатами предшествующих исследований [18, 19].

Роль БСА в качестве переносчика активно изучается в контексте повышения эффективности доставки лекарственных средств, в том числе противоопухолевых и гормональных [18].

В офтальмологии ранее были изучены особенности транссклерального электрофореза БСА, при этом показана эффективность его введения со стороны положительно заряженного электрода (анода), но отмечено, что при введении альбумина в качестве самостоятельной молекулы основной движущей силой является электроосмос, что обусловлено низким собственным зарядом на его поверхности [20].

Однако информации об использовании его в качестве транспортной среды для проведения электрофореза с противогрибковым средством в мировой литературе найдено не было.

Определение возможности повышения концентрации вориконазола в ткани роговицы при помощи электрофореза в транспортной среде МБСА (исследование ex vivo)

В ходе экспериментов на кадаверных глазах было обнаружено, что электрофорез вориконазола в гидрогеле МБСА приводит к более высоким концентрациям препарата в роговице по сравнению с обычными инстилляциями (12,85 мкг/мл против 3,05 мкг/мл, $p < 0,05$), что может обеспечить более эффективное и пролонгированное действие препарата.

Эти данные частично согласуются с результатами применения электрофореза 1 % раствора вориконазола, показавшими кратное увеличение концентрации в тканях по сравнению с простыми инстилляциями [9], а также с данными, полученными при применении электрофореза вориконазола в комплексе с циклодекстрином (торговая форма лиофилизата вориконазола) и в составе липосом (синтезированная транспортная форма). Однако указанные результаты противоречивы, поскольку показано, что электрофорез приводит к повышению концентрации вориконазола в составе липосом, тогда как для простого раствора лиофилизата в физиологическом растворе NaCl 0,9 % движущей силой может быть лишь электроосмос, что не может обеспечивать высокой концентрации лекарственного средства в тканях [10].

Различные методы глазного электрофореза давно и широко используются в офтальмологии. При этом ванночковый электрофорез обладает рядом преимуществ, в первую очередь за счет непосредственного контакта вводимого раствора с поверхностью роговицы,

что делает его полезным при кератитах. Однако список препаратов, вводимых при помощи ванночкового электрофореза при кератитах, ограничен. В него входит ряд антибиотиков и антисептиков. Несмотря на присутствие в отечественной литературе упоминаний о применении электрофореза препаратов нистатина и леворина, электрофорез с противогрибковыми лекарственными средствами пока широко не распространен [21, 22].

Оценка эффективности электрофореза вориконазола в гидрогеле МБСА

в экспериментальных условиях in vivo

Эффективность модели заражения

В ходе исследования все лабораторные животные были успешно заражены на 7–9-е сутки от начала активной контаминации, что говорит о высокой воспроизводимости используемой методики.

При анализе клинических признаков выраженности воспаления оказалось, что как электрофорез вориконазола, так и его частые инстилляции обеспечивают схожее снижение баллов по шкале раздражения глазной поверхности. Эти результаты соответствуют исследованиям, показывающим схожую клиническую эффективность азолов в моделях кератита при частом местном применении, однако комбинированное физиотерапевтическое воздействие на фоне гидрогеля позволяет снизить частоту процедур без потери терапевтического эффекта [23].

Оценка ОКТ-критериев

Данные ОКТ-исследования на 8-е сутки лечения показали сходную динамику восстановления структуры роговицы при обеих методиках введения вориконазола: коэффициенты изменения площади среза роговицы на опытных глазах в обеих сериях были ближе к нормальным значениям, чем контрольные, однако значимой разницы между опытными глазами серии электрофореза и инстилляций не было отмечено ($p > 0,05$), что говорит о сопоставимой эффективности обеих методик. При этом отсутствие разницы может быть объяснено меньшей чувствительностью ОКТ-исследования к минимальным изменениям структуры роговицы (разрешающая способность 5–10 мкм), а также относительно малым временным промежутком исследования [24].

Гистологические критерии

Результаты морфологического исследования показали большую чувствительность к изменениям, развивающимся в ткани роговицы. Так, толщина эпителия роговицы глаза кролика в опытной группе восстанавливалась быстрее по сравнению с контролем, но при электрофорезе она была статистически меньше, чем при инстилляциях ($p < 0,05$).

По данным литературы, токсичность для эпителия роговицы может возникать при глазном электрофорезе при чрезмерной силе тока, либо при электрофорезе агрессивных

растворов [25]. В связи с этим, несмотря на то, что толщина эпителия роговицы глаза в опытной группе при применении электрофореза была больше, чем на контрольных ($p < 0,05$), существует необходимость дальнейшего уточнения безопасной силы тока и длительности процедуры электрофореза вориконазола в гидрогеле МБСА во избежание чрезмерного раздражения глазной поверхности.

Однако при оценке инфильтрации стромы наблюдалось более выраженное снижение инфильтрации после проведения электрофореза по сравнению с простыми инстилляциями, что можно считать преимуществом данного метода.

Степень инфильтрации, по данным литературы, является одним из наиболее важных прогностических факторов, определяющих интенсивность воспалительной реакции и степень осложнений, таких как изъязвление и перфорация роговицы [26]. Снижение интенсивности инфильтрации, напротив, ассоциировано с лучшими исходами [27].

Таким образом, авторы считают данный критерий одним из показателей, определяющих преимущество использования предложенной методики электрофореза.

Ограничения исследования. В проведенном исследовании существует ряд ограничений. Первое – это ее экспериментальный характер, поскольку вся работа основана на экспериментальных моделях, что не всегда позволяет экстраполировать результаты на пациентов в реальной клинической практике.

Во-вторых, длительность наблюдения в эксперименте *in vivo* ограничивалась восемью сутками, а долгосрочные эффекты и возможные побочные реакции не оценивались. Кроме того, отсутствует анализ вариантов действия лечения против каких-либо грибков помимо вида *Fusarium solani*, данные о которых помогли бы всесторонне оценить эффективность разработанного метода.

Также существует необходимость разработки строгой стандартизации изготовления, контроля качества и стерильности гидрогеля МБСА, а также совершенствования его химико-физических параметров для минимизации раздражающего действия, что будет являться целью дальнейших исследований.

Заключение

Применение физиотерапевтического лечения в виде ванночкового электрофореза раствора вориконазола 1 % в гидрогеле МБСА является одним из эффективных способов повышения концентрации противогрибкового лекарственного средства в ткани роговицы и повышает эффективность лечения грибкового кератита в экспериментальной модели, что говорит о перспективности его дальнейшего изучения для применения в клинической практике.

Список литературы

1. Ahmadikia K., Aghaei G. S., Fallah B., et al. Distribution, Prevalence, and Causative Agents of Fungal Keratitis: A Systematic Review and Meta-Analysis (1990 to 2020) // *Front Cell Infect Microbiol.* 2021. Vol. 11. P. 698780. DOI: 10.3389/fcimb.2021.698780. PMID: 34513726. PMCID: PMC8428535.
2. Green M. D., Apel A. J., Naduvilath T., Stapleton F. J. Clinical outcomes of keratitis // *Clinical & Experimental Ophthalmology.* 2007. Vol. 35. P. 421-426. DOI: 10.1111/j.1442-9071.2007.01511.x.
3. Dave T. V., Dave V. P., Sharma S., et al. Infectious endophthalmitis leading to evisceration: spectrum of bacterial and fungal pathogens and antibacterial susceptibility profile // *J Ophthalmic Inflamm Infect.* 2019. Vol. 9(1). P. 9. DOI: 10.1186/s12348-019-0174-y. PMID: 31098742; PMCID: PMC6522574.
4. Menard M., Shah Y. S., Stroh I.G., et al. Microbial Profile and Clinical Outcomes of Fungal Keratitis at a Single-Center Tertiary Care Hospital // *Clin Ophthalmol.* 2022. Vol. 16. P. 389-399. DOI: 10.2147/OPTH.S346227. Erratum in: *Clin Ophthalmol.* 2022. Vol. 16. P. 1639-1640. DOI: 10.2147/OPTH.S375350. PMID: 35177897; PMCID: PMC8846617.
5. Шиловских О.В., Пономарев В.О., Тимофеев В.Л. Грибковый кератит. Часть 2. Диагностика и лечение // *Офтальмология.* 2023. Т. 20(4). С. 593–600. DOI: 10.18008/1816-5095-2023-4-593–600.
6. Егоров Е. А., Астахов Ю. С., Ставицкая Т. В. Общие принципы медикаментозного лечения заболеваний глаз // *Русский медицинский журнал. Клиническая Офтальмология.* 2004. Т. 5, № 1. URL: https://www.rmj.ru/articles/oftalmologiya/Obshchie_principiy_medikamentoznogo_lecheniya_zabolevaniy_glaz/ (дата обращения: 24.05.2026).
7. Lau D., Fedinands M., Leung L., et al. Penetration of voriconazole, 1 %, eyedrops into human aqueous humor: a prospective open-label study // *Arch Ophthalmol.* 2008. Vol. 126(3). P. 343-346. DOI: 10.1001/archophthalmol.2007.71. PMID: 18332313.
8. Al-Badriyeh D., Leung L., Roydhouse T., et al. Prospective open-label study of the administration of two-percent voriconazole eye drops // *Antimicrob Agents Chemother.* 2009. Vol. 53(7). P. 3153-3155. DOI: 10.1128/AAC.01700-08. PMID: 19433565; PMCID: PMC2704690.
9. Kalkanci A., Yesilirmak N., Ozdemir H.B., et al. Impact of Iontophoresis and PACK-CXL Corneal Concentrations of Antifungals in an In Vivo Model // *Cornea.* 2018. Vol. 37(11). P. 1463-1467. DOI: 10.1097/ICO.0000000000001696. PMID: 30161054.
10. Gelfuso G.M., Ferreira-Nunes R., Dalmolin L.F., et al. Iontophoresis enhances voriconazole antifungal potency and corneal penetration // *Int J Pharm.* 2020. Vol. 576. P. 118991. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118991. PMID: 31884059.
11. Чухно А.С., Шерстнев В. В., Ерастов С. В., Патрина Е. С. Создание биополимерных гидрогелей на основе модифицированных белков, альбумина и казеина, для применения в медицине // *Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине: Сборник научных трудов 6-й Международной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения*

профессора В. В. Соколовского (Санкт-Петербург, 20–21 ноября 2025 года). СПб: Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, 2025. С. 70-76. URL: <https://clck.ru/3Tx47G> (дата обращения: 25.05.2026).

12. Чухно А. С., Новикова Е. К., Сучкова К. М., Шерстнев В. В., Иванова И. С., Попов А. С.,

1. Чухно И. А., Попова А. А. Реологические свойства биополимерного гидрогеля на основе бычьего сывороточного альбумина как носителя биологически активных веществ для лечения заболеваний кожи // Бутлеровские сообщения. 2024. Т. 79. № 9. С. 108-118. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/24-79-9-108. URL: https://butlerov.com/files/reports/2005/vol7/1/15_10_20242124-79-9-108--C24-8-3-14-.pdf (дата обращения: 25.05.2026).

13. Сучкова К.М., Востряков Е. А., Попова А. А. Синтез биополимерного гидрогеля на основе БСА (бычьего сывороточного альбумина): строение, свойства, применение // Молодая фармация – потенциал будущего: Сборник материалов XIV всероссийской научной конференции с международным участием Молодежного научного общества СПХФУ (Санкт-Петербург, 28 марта – 02 апреля 2024 года). СПб: Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, 2024. С. 916-921. EDN: UZPPMU.

14. Григоров О. Н., Козьмина З. П., Маркович А. В., Фридрихсберг Д. А. Электрокинетические свойства капиллярных систем. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1956. 352 с.

15. Чухно А. С., Гурина С. В., Банкина А. Н., Ананьева Е. П., Дмитриева И. Б. Изучение электроповерхностных свойств мицелия базидиомицета *Abortiporus biennis* в зависимости от pH // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2014. №5 (10). С.32-38. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/izuchenie-elektropoverhnostnyh-svoystv-mitseliya-bazidiomitseta-a-bortiporus-biennis-v-zavisimosti-ot-rn> (дата обращения: 25.05.2026).

16. Давлетшина Н. И., Самойлов А. Н. Экспериментальная модель грибкового кератоувеита с язвой роговицы, основанная на анализе этиологии клинических наблюдений грибкового кератита // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н. И. Пирогова. 2023. Т. 18, № 3. С. 100-103. DOI: 10.25881/20728255_2023_18_3_100. EDN LNEBAN.

17. Патент № 2746647 С1 Российская Федерация. Способ создания экспериментальной модели грибкового кератита у кроликов: № 2020130970: заявл. 21.09.2020: опубл. 19.04.2021 / Самойлов А. Н., Давлетшина Н. И., Шакирова Ф. В. [и др.]; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. URL: <https://patents.google.com/patent/RU2746647C1/ru> (дата обращения: 25.05.2026).

18. Adamczyk O., Szota M., Rakowski K., et al. Bovine Serum Albumin as a Platform for Designing Biologically Active Nanocarriers-Experimental and Computational Studies // Int J Mol Sci. 2024. Vol. 25(1). P. 37. DOI:10.3390/ijms25010037. PMID: 38203208; PMCID: PMC10778598.

19. Романенко М.С. Криогели на основе бычьего сывороточного альбумина (БСА): синтез,

свойства, применение // Молодая фармация - потенциал будущего: Сборник материалов XII всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием. (Санкт-Петербург, 14 марта – 18 апреля 2022 года). СПб.: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2022. С. 827-832. EDN VOOJZU.

20. Chopra P., Hao J., Li S. K. Iontophoretic transport of charged macromolecules across human sclera // *Int J Pharm.* 2010. Vol. 388(1-2). P. 107-113. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.12.046. PMID: 20045044; PMCID: PMC2838613.

21. Дракон А. К., Патеюк Л. С., Шелудченко В. М., Корчажкина Н. Б. Лекарственный электрофорез в офтальмологии // *Вестник офтальмологии.* 2021. Vol. 137(6). P. 119-127. DOI: 10.17116/oftalma2021137061119.

22. Обрубов А. С. Эволюция отечественных взглядов и опыт местной фармакотерапии грибковых кератитов // *Российская детская офтальмология.* 2022. № 2. С. 39-47. DOI: 10.25276/2307-6658-2022-2-39-47.

23. Давлетшина Н. И., Самойлов А. Н. Эпидемиология и методы лечения грибковых кератитов // *Вестник офтальмологии.* 2020. Т. 136(4). С. 138-145. DOI: 10.17116/oftalma2020136041138.

24. Фисенко Н. В., Осипян Г.А. Оптическая когерентная томография в диагностике и лечении заболеваний роговицы // *Офтальмология.* 2021. Т. 18(3S). С. 703-711. DOI: 10.18008/1816-5095-2021-3S-703-711.

25. Егоров В. В., Смолякова Г. П., Коленко О. В. Физиотерапия в офтальмологии: учебное пособие. Хабаровск: ИПКСЗ, 2019. 140 с.

26. Майчук Д. Ю., Тарханова А. А., Лошкарева А. О., Дроздов И. А. Определение основных клинических характеристик грибкового кератита на основании опыта ведения пациентов с предоставлением клинического случая // *Современные технологии в офтальмологии.* 2021. Т. 39. № 4. С. 21-24. DOI: 10.25276/2312-4911-2021-4-21-24.

27. Бельская К. И., Обрубов А. С. Патогенез и клинические особенности течения грибковых кератитов (обзор литературы) // *Офтальмология.* 2021. Т. 18(1). С. 12–19. DOI: 10.18008/1816-5095-2021-1-12-19.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

Финансирование: Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования.

Financing: The research was performed without external funding.

Использование генеративного искусственного интеллекта: При создании настоящей статьи, а именно частей на английском языке (резюме, данные авторов, подписи файлов), был использован чат-бот GPT версия 5,1, (OpenAI, USA, <https://openai.com/ru-RU/index/chatgpt/>) с дальнейшей перепроверкой специалиста по переводу медицинской литературы. Период использования чат-бота – январь 2026 г.

Use of generative artificial intelligence: The GPT chatbot version 5.1 (OpenAI, USA, <https://openai.com/ru-RU/index/chatgpt/>) was used to create this article, specifically the English-language sections (abstract, author information, file signatures), with subsequent review by a medical literature translator. The chatbot will be in use until January 2026.