

На правах рукописи



**Шахова Валерия Николаевна**

**РАЗРАБОТКА НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ  
АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ, ОБЛАДАЮЩИХ  
МОДИФИЦИРОВАННЫМИ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИМИ  
ПАРАМЕТРАМИ**

4.2.1 Патология животных, морфология, физиология, фармакология и  
токсикология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Ставрополь – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ставропольский государственный аграрный университет»

- Научный консультант:** доктор ветеринарных наук, профессор  
**Беляев Валерий Анатольевич**
- Официальные оппоненты:** **Медетханов Фазил Акберович**  
доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана», заведующий кафедрой фармакологии, токсикологии и радиобиологии
- Мосягин Владимир Владимирович**  
доктор биологических наук, профессор, ФГБНУ «Курский федеральный аграрный научный центр», старший научный сотрудник лаборатории ветеринарной медицины и биотехнологий
- Шантыз Азамат Хазретович**  
доктор ветеринарных наук, профессор ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет им. И. Т. Трубилина», профессор кафедры биотехнологии, биохимии и биофизики
- Ведущая организация:** ФГБОУ ВО Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К. И. Скрябина

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 г. в \_\_\_ часов \_\_\_ минут на заседании диссертационного совета Д 35.2.036.02 на базе ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» по адресу: 355017, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 12.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» и на сайте: <http://www.stgau.ru>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г. и размещена сайтах: ВАК Министерства науки и высшего образования РФ <http://www.vak.minobrnauki.gov.ru> «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.; ФГБОУ ВО Ставропольского ГАУ <https://stgau.ru/> «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета, доцент



Шулунова Ангелина Николаевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Традиционные методы введения лекарственных препаратов, основанные на использовании таблеток, капсул, инъекций или мазей, обладают рядом существенных недостатков, которые ограничивают их эффективность и безопасность. Одной из проблем является нецелесообразное распределение лекарственных форм в организме, что не гарантирует доставку активного вещества непосредственно к биологическим мишеням, то есть клеткам или органам, нуждающимся в лечении. Это приводит к тому, что большая часть препарата не задействована в фармакодинамике в патологическом очаге, что способствует нарушению поддержания оптимальной терапевтической концентрации лекарственных веществ в течение необходимого времени. Еще одним существенным недостатком, даже при достижении необходимой концентрации является короткий период действия и период полувыведения, обусловленный быстрым выведением лекарственного вещества из организма. Увеличение суточной дозы может вызвать нежелательные побочные эффекты вплоть до серьезных аллергических реакций или повреждения внутренних органов (Соснов А. В. и др., 2008; Ивонин А. Г. и др., 2012; Шантыз А. Х., Марченко Е. Ю., 2020; Медетханов Ф. А., Конакова И. А. и др., 2023).

Система доставки лекарственного средства позволяет инкапсулированному в нее лекарственному веществу достигать терапевтической концентрации в определенном участке организма. Идеальная система доставки повышает эффективность и безопасность лекарственного средства, контролируя время, необходимое для достижения целевого органа, скорость и количество высвобождения лекарственного вещества в этом месте. Это становится возможным при контроле свойств разрабатываемых систем, таких как: состав, структура, размер, гидродинамические свойства, прочность, биосовместимость, биodeградируемость материалов, их стабильность. (Соснов А. В., Иванов Р. В. и др., 2008; Алексеев К. В., Аляутдин Р. Н. и др., 2009; Свирщевская Е. В., Гриневич Р. С. и др., 2012; Ивонин А. Г., Пименов Е. В., Оборин В. А. и др., 2012; Зайцева Е. А., Головин Ю. И. и др., 2016; Кулакова И. И. и др., 2018; Мельникова Е. В., Горячев Д. В. и др., 2018; Соколов А. В., Костин Н. Н. и др., 2019; Потапенков К. В., 2020; Галиуллина Л. Ф., 2021, Зелепукин И. В., 2021).

Обеспечить необходимую терапевтическую концентрацию лекарственных веществ в клетках-мишенях — сложная задача, для решения которой необходим специфичный носитель (Таран Т. В. 2004; Толчева Е. В., Оборотова Н. А., 2006; Ефременко Д. В., Таран Т. В. и др., 2008; Романова, Л. В., 2009; Зубарева А. А., 2013; Жанибекова Н., 2014; Балабаньян В. Ю., 2015; Нгуен, Х. К., 2015; Чегодарь Д. В., 2015; Карпенко И. Л., Сорокоумова Г. М., 2016; Кусков А. Н., 2017; Куликов О. А., Агеев В. П. и др., 2017; Жукоцкий А. В., Филатов Н. Н. и др., 2017; Гайар Б. В., Яп П. и др., 2019; Соколов И. Л., 2019; Хашем А., 2019; Третьякова, Д. С., 2020; Ковшова Т. С., 2021).

Разработка систем регулируемой доставки с включенными антибактериальными препаратами, обусловлена их очевидным преимуществом перед свободными лекарственными формами (Пятаев Н. А., 2007; Минаева О. В., 2008; Ротов К. А., Тихонов С. Н. и др., 2009; Тихонов С. Н., Ротов К. А. и др., 2011; Одинец А. В., Ефременко В. И. и др., 2007; Ермакова Д. А., Писаренко С. В., Ашихмина М. А., Куличенко А. Н., 2012; Ефременко Д. В., Ефременко В. И. и др., 2013; Левина, Т. М., 2013; Хатков Э. М., 2014; Юсифов З. А., 2017; Паценко М. Б., Балабаньян В. Ю., Гельперина С. Э., 2018).

Применение новых лекарственных форм препаратов, иммобилизованных в наночастицы может обеспечивать постоянство концентрации при низкой курсовой дозе, что предупредит негативные побочные реакции антибиотикотерапии, которые

закljučаются в проявлении токсического эффекта, возникновении антибиотикорезистентности, при этом терапевтическая и экономическая эффективность повышается за счет сокращения времени лечения больных животных и их быстрого восстановления, снижения стоимости терапии и осложнений после перенесенного заболевания.

**Степень разработанности проблемы.** В отечественной и зарубежной медицинской литературе имеются публикации, посвященные перспективным подходам к разработке и синтезированию альтернативных фармакологических форм с высокой антимикробной активностью – препаратов на основе липосом, нанокристаллов и нанопорошков, различных природных и искусственных соединений (Ротов К. А., Снатенков Е. А. и др., 2005; Шоуа, И. Б., 2005; Исмаилова Г. К., Жилченко Е. Б. и др., 2007; Степанов В. А. и др., 2009; Абаева Л. Ф. и др., 2010; Алешина Е. С. и др., 2011; Лепарская Н. Л., 2011; Карлина М. В., Косман В. М. и др., 2013; Савин Е. И., Субботина Т. И. и др., 2014; Шульгина Т. А., 2015; Шахмаев А. Е., Кацай А. Л. и др., 2015; Яценюк А. М., 2016; Хералова Н. И., 2021; Акулов С. В., Фролов Г. А., Карасенков Я. Н., Дельцов А. А., 2022; Мосягин В. В., Рыжкова Г. Ф., 2022; Дельцов А. А., Акулова С. В., 2023; Мосягин В. В., Беляев А. Г., 2023; Мосягин В. В., 2023; Мосягин В. В., Попов В. С. и др., 2023; Gupta U. et al., 2006; Fencke D. V. et al., 2008; Chan H. K., 2011; Gurunathan S. et al., 2014; Franci G. et al., 2015).

Однако практических разработок систем доставки обладающих таргетностью и изучения их влияния на организм мелких домашних и сельскохозяйственных животных в ветеринарной медицине практически нет, а имеющиеся опытные образцы для применения при различных патологических состояниях используются крайне редко и изучены недостаточно в области определения скорости высвобождения, срока хранения и годности, фармако-токсикологической оценки, биораспределения и циркуляции в живом организме, определения терапевтических доз для действующих веществ, инкорпорированных в новые системы доставки и их терапевтическая и профилактическая эффективность.

**Целью исследований** явилась разработка новых лекарственных форм антибактериальных препаратов, обладающих модифицированными фармакокинетическими параметрами.

**Задачи исследования:**

1. Разработать, апробировать способы получения ниосомальных форм антибактериальных препаратов группы цефалоспоринов, фторхинолонов, аминогликозидов со сниженным индексом полидисперсности, но обладающих повышенной эффективностью включения.
2. Определить скорость высвобождения действующих веществ из ниосом *in vitro*, подтверждающую изменения в фармакокинетики антибактериальных препаратов.
3. Выявить возможность хранения ниосомальных дисперсий с включенными антибактериальными препаратами.
4. Провести токсикологическую оценку ниосомальных форм антибактериальных препаратов.
5. Изучить взаимодействие ниосом с модифицированными фармакокинетическими параметрами с компонентами крови, участвующими в процессе доставки действующих веществ.
6. Оценить чувствительность культур к свободным и ниосомальным формам антибактериальных препаратов, используемых для моделирования патологий у лабораторных животных *in vitro*.

7. Определить минимальную бактерицидную концентрацию и минимальную подавляющую концентрацию у свободных и ниосомальных форм антибактериальных препаратов.
8. Рассчитать терапевтические дозы ниосомальной формы цефотаксима, ниосомальной формы офлоксацина, ниосомальной формы гентамицина для лабораторных животных с патологиями бактериальной этиологии.
9. Выявить терапевтическую эффективность применения ниосомальных форм антибактериальных препаратов при индуцированном внутрибрюшном инфицировании.
10. Проанализировать терапевтическую эффективность применения ниосомальных форм антибактериальных препаратов у продуктивных животных с патологиями дыхательной системы.
11. Оценить экономическую эффективность различных лекарственных форм антибактериальных препаратов при их использовании в схемах лечения у телят с заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей бактериальной этиологии.

**Научная новизна.** Впервые теоретически обоснована необходимость синтеза ниосомальных лекарственных форм антибактериальных препаратов, обладающих модифицированными фармакокинетическими параметрами, перспективными для лечения и профилактики патологий органов грудной и брюшной полости мелких домашних и сельскохозяйственных животных. Усовершенствованы существующие технологии получения ниосомальных форм антибактериальных препаратов.

Изучены фармако-токсикологические свойства ниосомальных форм антибактериальных препаратов. Определены минимальная подавляющая концентрация, а также минимальная бактерицидная концентрация ниосомальных форм антибактериальных препаратов при воздействии на грамположительную и грамотрицательную микрофлору. Установлена терапевтическая эффективность ниосомальных форм антибактериальных препаратов у лабораторных животных с индуцированными патологиями. Определена эффективность применения разработанных лекарственных форм при лечении телят с заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей.

Впервые разработаны и запатентованы способ получения ниосомальной формы цефотаксима (патент на изобретение РФ № 2687496 от 08.10.18 г.), способ получения ниосомальной формы гентамицина (патент на изобретение РФ № 2805933 от 09.02.2023 г.), способ фракционирования ниосом (патент на изобретение РФ № 2754849 от 20.07.2020 г.), способ определения скорости высвобождения инкапсулированного в ниосомы цефотаксима *in vitro* (патент на изобретение РФ № 2754850 от 20.07.2020 г.), способы определения аминогликозидных антибиотиков (патент на изобретение РФ № 2786839 от 15.11.2022 г.) и цефотаксима методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (патент на изобретение РФ № 2687493 от 08.10.18 г.), способ определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам при лечении гнойно-воспалительных заболеваний животных (патент на изобретение РФ № 2804102 от 15.11.2022 г.), способы моделирования интраперитонеального стафилококкового (патент на изобретение РФ № 2723745 от 21.11.2019 г.) и синегнойного инфекционных процессов (патент на изобретение РФ № 2725136 от 21.11.2019 г.), способ лечения интраперитонеального стафилококкового инфекционного процесса ниосомальным офлоксацином (патент на изобретение РФ № 2749374 от 29.10.2020 г.).

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Значимость работы обусловлена тем, что в результате ее выполнения: предложены новые безопасные, экономически и терапевтически эффективные ниосомальные лекарственные формы

антибактериальных препаратов. Разработан и проведен количественный анализ на содержание антибактериальных препаратов в свободных и полученных нами ниосомальных формах методом ультрафиолетовой спектрофотометрии и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Выполнено многопараметрическое исследование гомогенности ниосомальных дисперсий посредством проточной цитометрии.

Разработаны и оптимизированы методы вне- и внутриклеточной визуализации созданных пегелированных ниосомальных везикул, используемых для внутриклеточной доставки активных субстанций с применением оптической и электронной сканирующей микроскопии образцов, а также методом динамического рассеяния света, которые позволили детектировать форму, размер частиц, особенности поверхности везикул. Апробированы схемы лечения телят с заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей бактериальной этиологии, предусматривающие использование ниосомальных лекарственных форм антибактериальных препаратов.

Полученные результаты исследований могут быть использованы в практическом животноводстве для лечения и профилактики заболеваний продуктивных животных, научно-исследовательской и образовательной деятельности учреждений биологического, ветеринарного, биотехнологического профиля в качестве информации, характеризующей особенности разработки, клинико-терапевтической оценки ниосомальных форм антибактериальных препаратов. Результаты исследований изложены в учебно-методическом пособии «Применение антибактериальных препаратов в составе ниосомальных везикул в терапии заболеваний животных», рекомендованы к изданию Краснодарским научно-исследовательским ветеринарным институтом – обособленным структурным подразделением ФГБНУ «КНЦЗВ», ФГБОУ ВО Кубанским ГАУ, Пермским государственным аграрно-технологическим университетом им. академика Д.Н. Прянишникова (утверждены НТС ФГБОУ ВО Ставропольским ГАУ 25.10.24, протокол № 12).

Результаты научных исследований В. Н. Шаховой вошли в отчеты по научно-исследовательской работе ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» за 2019-2023 годы. Материалы исследований используются в учебном процессе по курсам дисциплин «Ветеринарная фармакология», «Токсикология» и «Внутренние незаразные болезни» в ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет».

Полученные экспериментальные данные в виде 10 патентов на изобретение – патент № 2687496 от 08.10.18, патент № 2805933 от 09.02.2023, патент № 2723745 от 21.11.2019, патент № 2725136 от 21.11.2019, патент № 2749374 от 29.10.2020, патент № 2754849 от 20.07.2020, патент № 2754850 от 20.07.2020, патент № 2786839 от 15.11.2022, патент № 2687493 от 08.10.2018, патент № 2804102 от 15.11.2022, апробированы и используются в сельскохозяйственных организациях, крестьянско-фермерских хозяйствах Ставропольского края, Краснодарского края, Кабардино-Балкарской Республики. Разработанные способы применения ниосомальных форм антибактериальных препаратов у продуктивных животных внедрены в сельскохозяйственном производственном кооперативе племенном репродукторе «Красный Маныч», сельскохозяйственном производственном кооперативе племзаводе «Путь Ленина», сельскохозяйственном производственном кооперативе «Владимировский», ИП «Демченко» Шпаковского района, КФХ Барсук Т. Л. Краснодарского края, Павловского района; ООО «Колхоз Псынадаха» Кабардино-Балкарской Республики.

**Методология и методы исследования.** Основой методологии исследований явилась научно обоснованная постановка проблемы разработки, изучения фармако-

токсикологических свойств и методов эффективного применения в ветеринарии полученных нами лекарственных форм антибактериальных препаратов, обладающих модифицированными фармакокинетическими параметрами. В процессе выполнения исследований был использован широкий спектр химических, физических, клинических, биохимических, гематологических, бактериологических, морфологических, фармакокинетических, токсикологических и статистических методов.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Состав и размер предложенных ниосомальных дисперсий для цефотаксима, офлоксацина и гентамицина подбираются индивидуально.

2. Разработанные рецептуры позволяют получить ниосомальные везикулы с высокой эффективностью инкорпорирования антибактериальных препаратов и модифицированной скоростью высвобождения.

3. Ниосомальные формы антибактериальных препаратов относятся к 4 классу токсичности, к веществам со слабо выраженной кумуляцией и не обладают местно-раздражающим и аллергизирующим эффектами, что позволяет отнести к классу веществ, не проявляющих раздражающего действия.

4. Использование ниосомальных форм антибактериальных препаратов с измененными фармакокинетическими параметрами способствует постоянству терапевтической концентрации в очаге воспаления при индуцированных патологиях у лабораторных животных.

5. Включение разработанных ниосомальных форм в схему лечения патологий дыхательной системы у продуктивных животных способствует повышению эффективности существующей комплексной терапии.

6. Применение ниосомальных форм антибактериальных препаратов крупному рогатому скоту при лечении заболеваний верхних и нижних дыхательных путей бактериальной этиологии способствует повышению показателей экономической эффективности в животноводстве.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов обусловлена большим объемом экспериментального материала, а также подтверждается использованием современных методов исследования, сертифицированного оборудования и проведением статистической обработки данных. Результаты исследования опубликованы в рецензируемых изданиях, апробированы на специализированных научных конференциях и получили государственную поддержку в виде грантового финансирования.

Проведение исследований, составивших основу диссертационной работы, поддержано финансированием из бюджетных средств Российской Федерации в рамках реализации в конкурсе молодых ученых и аспирантов, осуществляющие перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики на 2018-2020 годы на право получения стипендии Президента Российской Федерации по теме: «Разработка технологии получения ниосомальных форм антибактериальных препаратов в терапии системных заболеваний»; в конкурсе поддержки исследовательских проектов коллективов Ставропольского государственного аграрного университета Программы развития университета «Агроиннополис-2030», выполняемой в рамках программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030» по теме: «Экспериментальное исследование антибактериальной активности наноразмерных систем доставки лекарств *in vivo* и разработка лечебно-профилактических мероприятий при заболеваниях сельскохозяйственных животных в рамках развития аграрного сектора экономики России (по направлению – биотехнологии)» (2022-2024 гг.); в программе грантов АО «Россельхозбанк» 2023 г. по теме: «Применение инновационных лекарственных форм

антибактериальных препаратов, обладающих способностью бактерицидного действия на антибиотикорезистентные штаммы при заболеваниях животных различной этиологии».

Основные положения диссертационной работы были представлены, обсуждены и положительно охарактеризованы: на ежегодных научно-практических конференциях «Инновационные технологии в сельском хозяйстве, ветеринарии и пищевой промышленности» (г. Ставрополь, 2018 – 2024 гг.); V-й Международном конгрессе ветеринарных фармакологов и токсикологов «Эффективные и безопасные лекарственные средства в ветеринарии», посвященного 145-летию со дня рождения профессора Савича Владимира Васильевича (г. Санкт-Петербург, 2019 г.), Международной научно-практической конференции «Теория и практика клинической биохимии и лабораторной диагностики», посвященная 100-летию кафедры биохимии и физиологии СПбГАВМ (г. Санкт-Петербург, 2019 г.), международной научно-практической конференции «Достижения и перспективы развития ветеринарной медицины, посвященной 20-летию создания кафедры специальных ветеринарных дисциплин Иркутского ГАУ» (г. Иркутск, 2020 г.), II научно-практической конференции, «Зоотехническая наука в условиях современных вызовов» (г. Киров, 2020 г.); международная конференция XIII International Scientific and Practical Conference «State and Prospects for the Development of Agribusiness – INTERAGROMASH 2020» (г. Ростов-на-Дону, 2020 г.), международной научно-практической конференции «Современные проблемы патологии животных, морфологии, физиологии, фармакологии и токсикологии», посвящённая 95-летию со дня рождения академика В.П. Шишкова (Москва, 2022 г.); международной научной конференции «Инновационные научные разработки – развитию агропромышленного комплекса», посвященная 300-летию Российской академии наук, 110-летию со дня образования Ставропольского НИИСХ, 90-летию основания Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства и 85-летию Ставропольской опытной станции по садоводству (Ставрополь, 2022 г.); международной научно-практической конференции «Молодые ученые – науке и практике АПК» (Витебск, Беларусь, 2023 г.); международной научно-практической конференции EBWFF 2023 – International Scientific Conference Ecological and Biological Well-Being of Flora and Fauna (Благовещенск, 2023 г.); международной научно-практической конференции Юбилейная Международная научно-практическая конференция, посвященная 125-летию со дня создания ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (Москва, 2023 г.).

**Личный вклад соискателя.** Постановка научной проблемы, формулирование цели и задач, организация и проведение исследований, а также статистическая обработка результатов выполнялись лично автором в течение двенадцати лет. Доля участия соискателя при выполнении работы составляет 85 %.

**Публикация результатов исследований.** По материалам исследований опубликована 41 научная работа, где отражены основные положения и выводы по теме диссертации, в том числе 13 работ в изданиях, включенных в Перечень Российских рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК РФ для опубликования основных научных результатов диссертаций («Вестник Ветеринарии», «Вестник АПК Ставрополя», «Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии», «Ветеринарная патология», «Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии», «Аграрный вестник Северного Кавказа») и 3 статьи в научных изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science и Scopus. Издано 1 учебно-методическое пособие. Получены в соавторстве 10 патентов Российской Федерации на изобретения.



**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, включающих материалы и методы исследований, результаты исследований и их анализ, заключения, выводов, практических предложений, перспективных решений, списка литературы и приложений. Содержание работы изложено на 370 страницах машинописного текста, включает 92 таблиц и 72 рисунков. Библиографический список состоит из 466 источников, в том числе 278 иностранных.

## **ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ**

### **1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

В обзоре представлены данные научной литературы, включающие факторы, влияющие на эффективность применения наночастиц в терапии, биораспределение и взаимодействие наночастиц в организме, разработку и применение наноразмерных систем доставки, ниосомальные системы доставки, современные отечественные и иностранные результаты применения ниосомальных систем для доставки различных антибактериальных препаратов.

### **2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

#### **2.1. Материалы и методы исследования**

Работа выполнена в период с 2012 года по 2024 год на кафедре терапии и фармакологии, в лаборатории доклинических исследований, научно-испытательной лаборатории кафедры эпизоотологии и микробиологии, НДиЛВЦ ФГБОУ ВО «Ставропольского государственного аграрного университета, ФКУЗ «Ставропольском научно-исследовательском противочумном институте» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Испытания терапевтической эффективности разработанных ниосомальных форм антибактериальных препаратов проводились в ООО «Колхоз Псынадаха» Кабардино-Балкарской Республики; КФХ Барсук Т.Л. Павловского района, Краснодарского края; в сельскохозяйственном производственном кооперативе племенной репродуктор «Красный Маныч», сельскохозяйственном производственном кооперативе «Владимировский» Туркменского района Ставропольского края, ИП «Демченко» Шпаковского района Ставропольского края.

При проведении экспериментов в рамках диссертационной работы использовано 800 белых мышей, 600 белых лабораторных крыс, 240 кроликов, 300 телят в возрасте 2,5–3,0 месяца. Содержание и уход за лабораторными животными осуществлялись в соответствии с ГОСТ 33215-2014, кормление по ГОСТ Р 50258—92.

Были разработаны и получены ниосомальная форма цефотаксима (патент № 2687496) и ниосомальная форма гентамицина (патент № 2805933). Ниосомальную форму офлоксацина изготавливали согласно патента № 2583135.

Изображение ниосомальных везикул в составе полученных лекарственных форм проводили с помощью сканирующей зондовой микроскопии в электронном микроскопе для биологических исследований EVO LS 10 (Carl Zeiss, NTS Германия).

Для получения препаратов пригодных к изучению в электронном микроскопе взвесь везикул разводили в дистиллированной воде по стандарту мутности Государственного НИИ стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича. За единицу мутности была принята мутность суспензии живых клеток бактерий-возбудителей тифа в физиологических растворах, содержащих в 1 мл 100 млн клеток. Полученные препараты высушивали на воздухе и сканировали в электронном микроскопе для определения формы и размера частиц (Д. А. Ковалев, А. М. Жиров, В. Н. Шахова и др., 2019).

Расчет индекса полидисперсности определяли по формуле

$$\text{ИП} = \frac{r_w}{r_n} = \frac{\sum N_i r_i^4 / \sum N_i r_i^3}{\sum N_i r_i / \sum N_i},$$

где  $r_w$  – среднемассовый радиус,  $r_n$  – среднечисленный радиус,  $N_i$  – общее количество измеренных везикул,  $r_i$  – результат отдельного измерения радиуса частицы.

Средний размер частиц ниосомальных дисперсий с включенным гентамицином / цефотаксимом определяли методом динамического рассеяния света («Zetasizer Nano», «Malvern Instruments», США) (Д.А. Ковалев, А.М. Жиров, В.Н. Шахова и др., 2019). Средний размер частиц ниосомальных дисперсий с включенным офлоксацином определяли методом зондовой микроскопии в режиме контактной АСМ (универсальная сканирующая зондовая нанолaborатория NTEGRA Prima, NT-MDT, Россия) (А. Н. Куличенко, М. Е. Михайлова и др., 2014).

Исследование гомогенности дисперсий с помощью проточной цитометрии проводили на приборе «Attune». Параметры измерения: объем пробы – 300 мкл, скорость потока – 100 мкл/мин. Условия прекращения регистрации: 10000 частиц, 5 мин. Для анализа результатов выбирали оси соответствующих гистограмм: Count – VL1-H, VL1-H – VL2-H (Патент № 2687496).

Количественный анализ на содержание антибиотиков проводили методом ультрафиолетовой спектрофотометрии и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (Патент № 2687493, Патент № 2786839, А. Н. Куличенко, М. Е. Михайлова и др., 2014). Эффективность включения антибиотика определяли относительно исходной концентрации по формуле:

$$\text{ЭВ} = C/C_{\text{исх}} \cdot 100 \%,$$

где ЭВ – эффективность включения цефотаксима в ниосомы, %;  $C$  – концентрация антибиотика, мг/мл;  $C_{\text{исх}}$  – исходная концентрация антибиотика в растворе, мг/мл.

Неинкапсулированный антибактериальный препарат устраняли центрифугированием дисперсии при 12100 об/мин в течение 60 минут (для цефотаксима и гентамицина); при 13400 об/мин в течение 30 минут (для офлоксацина) после разбавления аликвоты препарата 0,025 М раствором  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  в соотношении 1:10 по объему. Супернатант в объеме добавленного буферного раствора отделяли и отбрасывали (А. Н. Куличенко, М. Е. Михайлова и др., 2014). Для полного удаления свободного антибиотика процедуру повторяли дважды. Концентрации антибиотиков определяли спектрофотометрией и ВЭЖХ.

Для изучения стабильности ниосомальных форм антибактериальных препаратов использовались дисперсии, полученные методом обращенно-фазовой отгонки, при этом определялся размер, эффективность включения действующего вещества. Аликвоты препаратов хранили отдельно при  $4 \pm 2$  °С и  $22 \pm 2$  °С в течение 6 месяцев. В хранящихся образцах каждые 15 дней исследовали изменения основных показателей качества ниосомальной дисперсии. Средний размер частиц определяли методом динамического рассеяния света (Zetasizer Nano, Malvern Instruments, США) и методом зондовой микроскопии. Проводили измерение концентрации антибактериального препарата инкапсулированного в ниосомы методом ВЭЖХ (В. Н. Шахова, А. М. Жиров, Д. А. Ковалев, и др., 2021).

Фракционирование ниосомальной дисперсии от крупных частиц и остатков компонентов ниосом проводили центрифугированием (патент на изобретение РФ № 2754849 от 20.07.2020 г.).

Определение скорости высвобождения инкапсулированных в ниосомы антибактериальных препаратов *in vitro* осуществляли согласно патенту на изобретение РФ № 2754850 от 20.07.2020 г.

Для изучения взаимодействия ниосомальных везикул и компонентов крови с использованием оптической и электронной микроскопии объектом исследования были выбраны дисперсии ниосом, содержащие частицы размером от 20 до 950 нм, полученные методом обращенно-фазовой отгонки.

Токсикологическая оценка ниосомальных лекарственных форм антибактериальных препаратов проводилась в соответствии с руководствами Р. У. Хабриева (2005), А. Н. Миронова (2012), а также по межгосударственным стандартам по изучению токсичности, в соответствии с Приказом Минсельхоза России от 06.03.2018 № 101 и Приказом Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н.

Эксперименты на лабораторных животных осуществляли в соответствии с Директивой 2010/63/еу Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года, по охране животных, используемых в научных целях, Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях и приказом Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12.08.1977.

Оценку кумуляции проводили методом R. K. Lim (1961), позволяющим изучить не только кумулятивные свойства, но и привыкание. Классификация химических веществ по кумуляции в организме животного проводили по Л. Н. Медведю, 1964.

С целью определения алергизирующих свойств ниосомальных форм антибактериальных препаратов использовали метод накожных аппликаций и конъюнктивальную пробу на кроликах – согласно руководству Р. У. Хабриева, 2005, А. Н. Миронова, 2012.

Для получения фармакокинетических показателей исследуемых лекарственных форм использовали плазму крови и внутренние органы лабораторных животных – мышей. Пробы получали через определенное количество времени после однократного введения свободной или ниосомальной форм антибактериальных препаратов. Для изучения биораспределения выделяли головной мозг, печень, легкое, почку, опухоль, сердце и селезенку и промывали охлажденным изотоническим физиологическим раствором. Каждую ткань (1 г) гомогенизировали в 3 мл фосфатного буфера (рН 7,4). Гомогенат центрифугировали при 6000 об/мин при 4°C в течение 30 мин. Супернатант собирали в пробирки и хранили при температуре -20 °С до использования. Концентрацию действующих веществ в свободных и ниосомальных формах определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Ultimate3000 (Dionex Corp., США). Значение максимальной концентрации антибактериальных препаратов в плазме крови, время достижения их максимальной концентрации в плазме и время полувыведения рассчитывали на основании кривой зависимости средней концентрации антибиотика от времени после однократного введения свободной или ниосомальной формы (А. Н. Куличенко, М. Е. Михайлова, Д. А. Ковалёв и др., 2014).

Чувствительность к антибактериальным препаратам проводилась согласно ГОСТ Р 51600-2010: Микробиологические методы определения наличия антибиотиков и руководству по клинической лабораторной диагностике «Определение чувствительности микроорганизмов к antimикробным препаратам» диско-диффузионным методом (2015).

Определение минимальной подавляющей и минимальной бактерицидной концентраций у ниосомальных и свободных форм антибактериальных препаратов производилось *in vitro*, на основании динамики роста культур в мясо-пептонном бульоне методом серийных разведений.

Расчет терапевтических доз ниосомальных форм антибактериальных препаратов для лабораторных животных с патологиями бактериальной этиологии проводили в соответствии с руководством А. Н. Миронова (2012).

С целью моделирования интраперитонеального стафилококкового инфекционного процесса у кроликов (патент №2723745) использовали штамм: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P = FDA 209-P = NCTC № 7447 = CCM 2022 = CIP 53,156 = WDCM 00033, номер штамма 201108. Для моделирования внутрибрюшинного синегнойного инфекционного процесса (патент №2725136) использовали штамм: *Pseudomonas aeruginosa* № 453, номер штамма 190158, полученный из института Хирургии им. А. В. Вишневского, г. Москва.

Для изучения морфологических структур при смоделированных инфекционных процессах материал (органы лабораторных животных) получали от кроликов, зараженных культурами *Staphylococcus aureus* или *Pseudomonas aeruginosa*. Вырезанный материал проходил гистологическую обработку на процессоре Thermo scientific Excelsior ES. Помещался в парафиновые блоки на системе заливки Thermo scientific Micro EC350-1. Срезы были произведены на роторном микротоме Varistain Gemini и окрашены по двум протоколам: 1. гематоокислин – эозин (клеточные структуры), 2. метиленовый синий по Леффлеру (бактериальная микрофлора).

Для определения гематологических показателей крови использовали ветеринарный автоматический гематологический анализатор DF 50 Vet, для определения биохимических показателей крови применяли автоматический биохимический анализатор Accent 200 cormay.

Заключительный этап исследований проводился в хозяйствах Ставропольского, Краснодарского краев и Кабардино-Балкарской республики с целью выявления действия ниосомальных форм антибактериальных препаратов в комплексной терапии телят с заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей. Диагностика данной патологии проводилась с учетом данных анамнеза, симптомов, результатов бактериологического анализа и выявления чувствительности к антибактериальным препаратам.

Отбор смывов осуществляли для проведения бактериологического исследования, а также оценки чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Для выделения смывов в носовые полости телят вводили стерильным одноразовым шприцом 1,0 мл тёплого стерильного изотонического раствора натрия хлорида. Промывную жидкость аспирировали шприцом в стерильную сухую и чистую пробирку, которую плотно закрывали. Проведение бактериологического исследования проводилось по ГОСТ Р 51600-2010: Микробиологические методы определения наличия антибиотиков; Н.М. Аль-Хаммаш, А.В. Игнатенко, 2012.

Полученные образцы в объеме 1 мл засеивали в концентрации 2 млрд мк/мл (стандарт мутности по Л. А. Тарасевичу) на поверхность мясо-пептонного агара, раскладывали бумажные диски, пропитанные антибиотиками (производство ООО «Нита-Фарм»), после этого чашки Петри устанавливали в термостат на 14 часов при температуре  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  (патент № 2804102).

Статистический анализ проводили с помощью пакета статистических и прикладных программ STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, США). Выполнялся подсчет средней величины ( $M$ ), средней ошибки ( $m$ ), которые представляли как  $M \pm m$ . Оценку значимости различий средних величин определяли по t-критерию Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ , где  $p$  – уровень значимости.

## 2.2. Результаты исследования и их анализ

В разделе изложены результаты научных исследований, опубликованные в научных статьях самостоятельно и в соавторстве, которые содержат уточненные, расширенные и новые сведения.

**2.2.1. Разработка, апробирование способов получения ниосомальных форм антибактериальных препаратов группы цефалоспоринов, фторхилолонов, аминогликозидов со сниженным индексом полидисперсности, но обладающих повышенной эффективностью включения**

Для разработки технологии получения наноразмерных систем доставки антибактериальных препаратов совместно с ФКУЗ Ставропольским научно-исследовательским противочумным институтом Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека было создано, апробировано несколько ниосомальных форм лекарственных препаратов с включенными антибактериальными препаратами, а именно цефотаксимом, гентамицином и офлоксацином. При выборе руководствовались показателями фармакокинетики и фармакодинамики данных лекарственных средств. Регистрировали основные характеристики такие как: эффективность включения действующих веществ, индекс полидисперсности, размер и геометрические пропорции, способность формирования субпопуляций везикул у разработанных ниосомальных форм антибактериальных препаратов.

**2.2.1.1. Разработка способа получения ниосомальной формы цефотаксима**

Способ получения ниосомальной формы цефотаксима (патент № 2687496) путем обращенно-фазовой отгонки, включал смешивание таких компонентов как: НПАВ, холестерин, дицетилфосфат и ПЭГ-4000 в различном молярном соотношении с хлороформом и с раствором цефотаксима (3 мг/мл) в 0,01 М фосфатно-солевом буфере рН 7,4 в соотношении органической и водной фаз 5:1. Затем, смесь подвергали воздействию ультразвукового дезинтегратора течение 5 минут, амплитудой 7,5 мкм, с частотой 20 кГц; эмульсию перемещали в круглодонную колбу с тефлоновой мешалкой и отгоняли хлороформ на роторном испарителе в течение 20 минут при давлении 0,175 Бар, температуре (26±1)°С и 150 оборотах в минуту, затем 25 минут при давлении 0,175 Бар, температуре (55±1)°С, 200 оборотах в минуту. К смеси добавляли 20% первоначального объема водной фазы и продолжали отгонку в течение 45 минут при давлении 0,175 Бар, температуре (26±1)°С и 140 оборотах в минуту, препарат переносили в чистую посуду и оставляли при (20±5)°С на 12 ч.

Для определения оптимального состава были использованы рецептуры, включающие Tween 60, холестерин в молярном соотношении 40:55; Tween 60, холестерин, дицетилфосфат – 40:55:5; Tween 60, холестерин, дицетилфосфат и ПЭГ-4000 в молярном соотношении 40:54:5:1; 50:44:5:1; 60:34:5:1. Эффективность инкапсуляции цефотаксима в ниосомы с ПЭГ и Tween 60 представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Эффективность включения цефотаксима в ниосомы с НПАВ Tween 60 и ПЭГ-4000 (M±m)

№ п/п	Tween 60, мол. %	Chol, мол. %	DCP, мол. %	ПЭГ-4000, мол. %	ЭВ, %
1	40	55	0	0	10,0±0,6
2	40	55	5	0	11,2±0,9
3	40	54	5	1	18,2±1,1*
4	50	44	5	1	19,6±0,9*
5	60	34	5	1	25,7±1,4*

*Примечание:* \*  $p \leq 0,05$  – разница статистически достоверна в сравнении с фоновыми показателями

Наиболее результативным оказался состав: Tween 60, холестерин, дицетилфосфат и ПЭГ-4000 в молярном соотношении 60:34:5:1, где эффективность включения цефотаксима составила 25,7±1,4%. Опытные препараты ниосом содержали сферические или овальные микровезикулы со средним размером частиц 252,0±55,0 нм. Индекс полидисперсности препаратов 0,21; частицы на гистограмме VL1-Н – VL2-Н формировали одну субпопуляцию (рисунок 1).

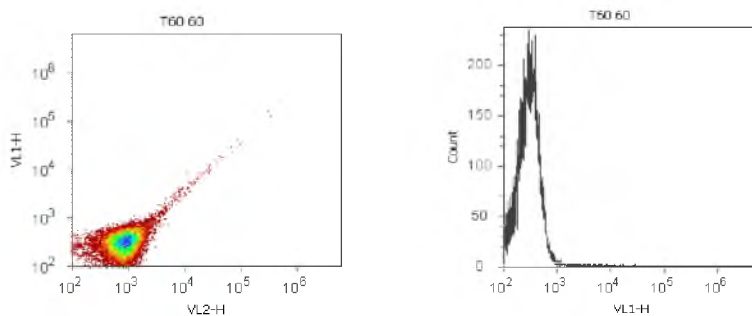


Рисунок 1 – Цитометрический анализ ниосомальных везикул в молярном соотношении 60:34:5:1 – Tween 60, холестерин, дицетилфосфат и ПЭГ-4000 соответственно

Однако эффективность включения с НПАВ Tween 60 оказалась низкой, поэтому продолжили поиск оптимального состава для синтеза ниосомальных везикул. Следующие рецептуры включали Span 80 и холестерин в молярном соотношении 40:55; Span 80, холестерин и дицетилфосфат 40:54:5; Span 80, холестерин, дицетилфосфат и ПЭГ-4000 в молярном соотношении 40:54:5:1; 50:44:5:1; 60:34:5:1. Эффективность инкапсуляции цефотаксима в ниосомы с ПЭГ и Span 80 представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Эффективность включения цефотаксима в ниосомы с НПАВ Span 80 и ПЭГ-4000 (M±m)

№ п/п	Span 80, мол. %	Chol, мол. %	DCP, мол. %	ПЭГ-4000, мол. %	ЭВ, %
1	40	55	0	0	36,4±2,2
2	40	54	5	0	38,4±1,9
3	40	54	5	1	40,2±2,4
4	50	44	5	1	46,6±2,8*
5	60	34	5	1	51,1±2,2*

*Примечание:* \*  $p \leq 0,05$  – разница статистически достоверна в сравнении с фоновыми показателями

Наиболее результативным оказался состав: Span 80, холестерин, дицетилфосфат и ПЭГ-4000 в молярном соотношении 60:34:5:1. Эффективность включения цефотаксима составила 51,1±2,2%. Опытные препараты ниосом содержали сферические или овальные везикулы со средним размером частиц 288±42 нм. Индекс полидисперсности 0,19; частицы на гистограмме VL1-H – VL2-H формировали одну субпопуляцию (рисунок 2).

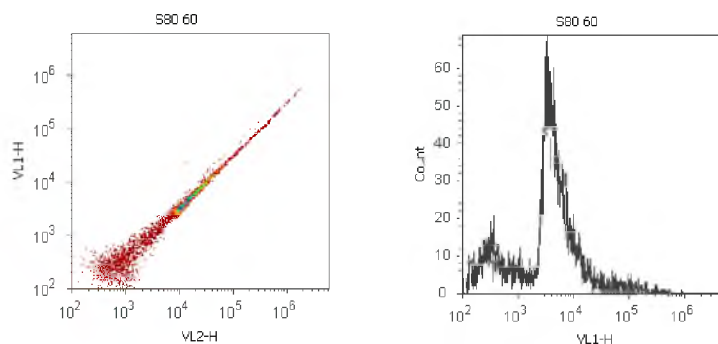


Рисунок 2 – Цитометрический анализ ниосомальных везикул в молярном соотношении 60:34:5:1 – Span 80, холестерин, дицетилфосфат и ПЭГ-4000 соответственно

Несмотря на то, что эффективность включения с НПАВ Span 80 превышала возможности НПАВ Tween 60, стратегически она не устраивала нас, поэтому продолжили поиск оптимального состава для синтеза ниосомальных везикул. Для определения оптимального состава были использованы рецептуры, включающие Span 60 (сорбитана моностеарат) и холестерин в молярном соотношении 40:55; Span 60, холестерин, дицетилфосфат – 40:54:5; Span 60, холестерин, дицетилфосфат и ПЭГ-4000 в молярном соотношении 40:54:5:1, 50:44:5:1, 60:34:5:1. Эффективность инкапсуляции цефотаксима в ниосомы с ПЭГ и Span 60 представлена в таблице 3.

Таблица 3 – Эффективность включения цефотаксима в ниосомы с ПЭГ и НПАВ Span 60

№ п/п	Span 60, мол. %	Chol, мол. %	DCP, мол. %	ПЭГ-4000, мол. %	ЭВ, %
1	40	55	0	0	45,9±2,4
2	40	54	5	0	47,2±2,0
3	40	54	5	1	49,2±1,3
4	50	44	5	1	55,3±1,5*
5	<b>60</b>	<b>34</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>63,7±1,2*</b>

*Примечание:* \*  $p \leq 0,05$  – разница статистически достоверна в сравнении с фоновыми показателями

Наиболее результативным оказался состав: Span 60, холестерин, дицетилфосфат и ПЭГ-4000 в молярном соотношении 60:34:5:1. Эффективность включения цефотаксима составила 63,7±1,2%. Индекс полидисперсности 0,21; частицы на гистограмме VL1-H – VL2-H формировали одну субпопуляцию (рисунок 3).

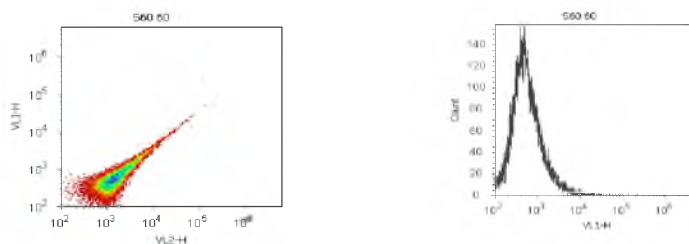


Рисунок 3 – Цитометрический анализ ниосомальных везикул в молярном соотношении 60:34:5:1 – Span 60, холестерин, дицетилфосфат и ПЭГ-4000 соответственно

Опытные препараты ниосом содержали сферические или овальные везикулы со средним размером частиц 280,0±6,0 нм (рисунок 4).

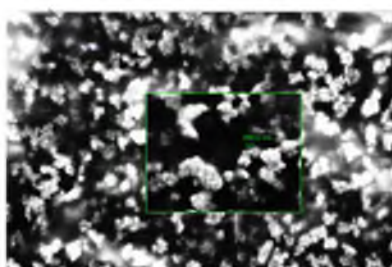


Рисунок 4 – Микрофотография частиц готовой ниосомальной дисперсии состава Span 60 – холестерин – дицетилфосфат с включенным цефотаксимом, полученная на приборе EVO LS 10 Carl Zeiss, NTS Германия.

Таким образом, **разработанный способ позволил получить** ниосомы содержащие униламеллярные сферические или овальные везикулы со средним размером  $280,0 \pm 6,0$  нм, с содержанием Span 60, холестерина, дицетилфосфата и ПЭГ-4000 в соотношении 60:34:5:1, что позволило достичь индекса полидисперсности в 0,21, что свидетельствовало о высокой степени гомогенности системы. Эффективность включения цефотаксима в ниосомы составила  $63,7 \pm 1,2\%$ .

#### 2.2.1.2. Разработка способа получения ниосомальной формы гентамицина

Способ получения ниосомальной формы гентамицина (патент № 2805933) путем обращенно-фазовой отгонки, включал смешивание таких компонентов как: НПАВ, холестерин, дицетилфосфат и ПЭГ-2000 в различном молярном соотношении с 50 мл хлороформа и с 10 мл водной фазы, представляющей собой раствор гентамицина в 0,02 М растворе фосфатно-солевого буфера с концентрацией 10 мг/мл. Затем смесь подвергали воздействию ультразвукового дезинтегратора в течение 5 минут, при амплитуде 7,5 мкм, частоте 20 кГц, из полученной эмульсии отгоняли хлороформ на роторном испарителе в режиме: в течение 25 минут при давлении 0,175 Бар, температуре  $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$  и 150 оборотах в минуту, затем 30 минут при давлении 0,175 Бар, температуре  $(55 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 200 оборотах в минуту, далее к смеси добавляли 20% первоначального объема водной фазы и продолжали отгонку в течение 45 минут при давлении 0,175 Бар, температуре  $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ , при 150 оборотах в минуту.

Для определения оптимального состава были использованы рецептуры, включающие Tween 60, холестерин в молярном соотношении 50:50; Tween 60, холестерин, дицетилфосфат – 50:45:5; Tween 60, холестерин, дицетилфосфат и ПЭГ-2000 в молярном соотношении 60:34:5:1; 50:44:5:1; 40:54:5:1. Эффективность инкапсуляции гентамицина в ниосомы с Tween 60 и ПЭГ-2000 представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Эффективность включения гентамицина в ниосомы с включением ПЭГ и НПАВ Tween 60

№ п/п	Tween 60, мол. %	Chol, мол. %	DCP, мол. %	ПЭГ-2000, мол. %	ЭВ, %
1	50	50	0	0	$16,9 \pm 1,8$
2	50	45	5	0	$18,2 \pm 2,2$
3	60	34	5	1	$19,8 \pm 2,0$
4	50	44	5	1	$20,9 \pm 2,6$
5	40	54	5	1	$15,5 \pm 1,3$

*Примечание:* \*  $p \leq 0,05$  – разница статистически достоверна в сравнении с фоновыми показателями.

Наиболее результативным оказался состав: Tween 60, холестерин, дицетилфосфат и ПЭГ-2000 в молярном соотношении 50:44:5:1, эффективность включения гентамицина составила  $20,9 \pm 2,6\%$ . Средний размер частиц  $270,3 \pm 56,2$  нм.

Однако эффективность включения с НПАВ Tween 60 оказалась низкой, поэтому продолжили поиск оптимального состава для синтеза ниосомальных везикул. Следующие рецептуры включали Span 80 и холестерин в молярном соотношении 50:50; Span 80, холестерин и дицетилфосфат 50:45:5; Span 80, холестерин, дицетилфосфат и ПЭГ-2000 в молярном соотношении 40:54:5:1; 50:44:5:1; 60:34:5:1. Эффективность инкапсуляции гентамицина в ниосомы с ПЭГ и Span 80 представлена в таблице 5.



Таблица 5 – Эффективность инкапсуляции гентамицина в ниосомы с включением ПЭГ и НПАВ Span 80

№ п/п	Span 80, мол. %	Chol, мол. %	DCP, мол. %	ПЭГ-2000, мол. %	ЭВ, %
1	50	50	0	0	38,5±2,2
2	50	45	5	0	40,8±2,7
3	60	34	5	1	42,5±3,0
4	50	44	5	1	48,7±1,4*
5	40	54	5	1	26,5±2,2*

Примечание: \*  $p \leq 0,05$  – разница статистически достоверна в сравнении с фоновыми показателями

При использовании Span 80 (сорбитана моноолеата), холестерина, дицетилфосфата и ПЭГ-2000 в молярном соотношении 50:44:5:1; максимальная эффективность включения гентамицина составила 48,7±1,4%. Средний размер частиц 296,4±62,0 нм.

Эффективность включения с НПАВ Span 80 не превышала 50%, поэтому продолжили поиск оптимального состава для синтеза ниосомальных везикул. Для определения оптимального состава были использованы рецептуры, включающие Span 60 (сорбитана моностеарат) и холестерин в молярном соотношении 50:50; Span 60, холестерин, дицетилфосфат – 50:45:5; Span 60, холестерин, дицетилфосфат и ПЭГ-4000 в молярном соотношении 40:54:5:1, 50:44:5:1, 60:34:5:1. Эффективность инкапсуляции гентамицина в ниосомы с ПАВ Span 60 и ПЭГ-2000 представлена в таблице 6.

Таблица 6 – Эффективность инкапсуляции гентамицина в ниосомы с включением ПЭГ и НПАВ Span 60

№ п/п	Span 60, мол. %	Chol, мол. %	DCP, мол. %	ПЭГ-2000, мол. %	ЭВ, %
1	50	50	0	0	49,1±3,2
2	50	45	5	0	65,0±4,5*
3	60	34	5	1	58,3±2,9*
4	<b>50</b>	<b>44</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>67,8±1,1*</b>
5	40	54	5	1	48,2±2,9

Примечание: \*  $p \leq 0,05$  – разница статистически достоверна в сравнении с фоновыми показателями

В результате анализа работы, наиболее оптимальным оказался состав: Span 60, холестерин, дицетилфосфат и ПЭГ-2000 в соотношении 50:44:5:1. Опытные препараты ниосом содержали униламеллярные сферические или овальные везикулы, средний размер 263,4±21,2 нм. Эффективность включения гентамицина в ниосомы составила 67,8±1,4%. Индекс полидисперсности 0,21; частицы формировали одну субпопуляцию.

### 2.2.1.3. Апробирование способа получения ниосомальной формы офлоксацина

Имеющийся способ получения ниосомальной формы офлоксацина (патент № 2583135) путем обращенно-фазовой отгонки, включал смешивание таких компонентов как: НПАВ, холестерин, дицетилфосфат и ПЭГ-4000/ПЭГ-115 в различном молярном соотношении с хлороформенным раствором и с водной фазой, содержащей офлоксацин, в соотношении 5:1 по объему, эмульгировали с помощью ультразвукового дезинтегратора в течение 5 мин (амплитуда 7,5 мкм, 20 кГц).

Нами проведены исследования различных рецептур ниосомальной формы офлоксацина. Эффективность инкапсуляции офлоксацина в ниосомы различного состава с НПАВ Span 60 и ПЭГ-115 представлена в таблице 7.

Таблица 7 – Эффективность инкапсуляции офлоксацина в ниосомы различного состава с НПАВ Span 60 и ПЭГ-115 ( $M \pm m$ )

№ п/п	Span 60, мол. %	Chol, мол. %	DCP, мол. %	ПЭГ-115, мол. %	ЭВ, %
1	7	4	0	0	50,20±3,30
2	7	4	1	0	55,80±3,50
3	7	4	1	0,2	73,20±4,40*

*Примечание:* \*  $p \leq 0,05$  – разница статистически достоверна в сравнении с фоновыми показателями

Эффективность инкапсуляции офлоксацина в ниосомы с ПАВ Span 60 и ПЭГ-4000 представлена в таблице 8.

Таблица 8 – Эффективность инкапсуляции офлоксацина в ниосомы различного состава с НПАВ Span 60 и ПЭГ-4000 ( $M \pm m$ )

№ п/п	Span 60, мол. %	Chol, мол. %	DCP, мол. %	ПЭГ-4000	ЭВ, %
1	60	50	0	0	47,70±2,30
2	55	47	5	0	51,40±3,10
3	45	37	5	1	65,80±4,00*
4	<b>35</b>	<b>27</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>76,10±1,70*</b>
5	25	17	5	1	63,40±3,80*

*Примечание:* \*  $p \leq 0,05$  – разница статистически достоверна в сравнении с фоновыми показателями

С помощью сканирующей зондовой микроскопии установлено, что среднее значение размера ниосомальных везикул составляло  $210 \pm 12,3$  нм, а состав ниосом, содержащий ПЭГ –  $250 \pm 19,2$  нм (рисунки 5, 6). Следовательно, включение в состав ПЭГ приводит к незначительному увеличению среднего размера частиц дисперсии по сравнению с препаратами, не содержащими ПЭГ; при этом среднее значение индекса полидисперсности препарата снижается с 0,24 до 0,19, что свидетельствует о некотором повышении гомогенности дисперсий.

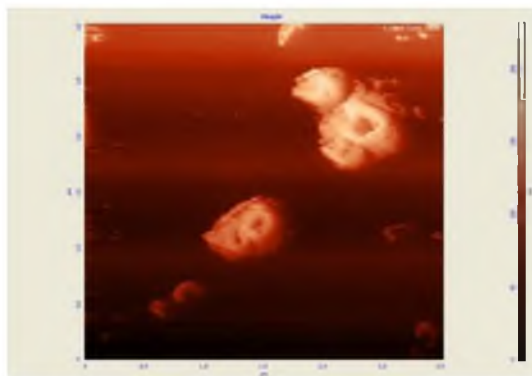


Рисунок 5 – Изображение образца препарата ниосом состава Span60-Chol-PEG-DCP (площадь фрагмента  $3 \times 3$  мкм, размер зонда 10 нм)

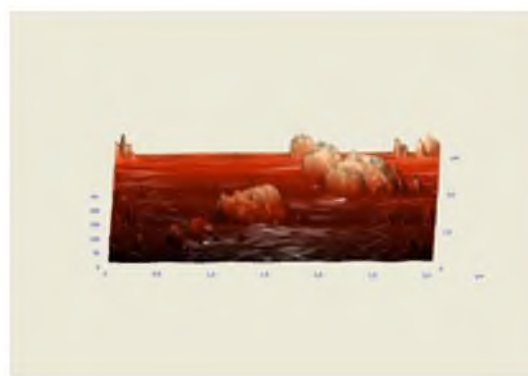


Рисунок 6 – 3D-модель образца препарата ниосом состава Span60-Chol-PEG-DCP (площадь фрагмента  $3 \times 3$  мкм, размер зонда 10 нм)

Учитывая, что основная часть инкапсулированного гидрофобного офлоксацина, вероятно, локализована в мембране везикул, повышение эффективности включения можно объяснить тем, что полиэтиленгликоль в составе ниосомальной дисперсии формировал на поверхности везикул дополнительный гидрофильный слой, увеличивая при этом толщину мембраны ниосом. Повышению эффективности включения антибактериального препарата также способствовало увеличение среднего размера частиц ПЭГ-содержащих препаратов по сравнению с несодержащими от 220 до 250 нм.

Таким образом, апробирование получения ниосомальной формы офлоксацина позволило использовать изображение образца препарата ниосом состава Span60-Chol-PEG-DCP для подтверждения размера и формы ниосомальных везикул, установлено что ниосомы содержали униламеллярные сферические или овальные везикулы, размером  $250,0 \pm 19,2$  нм. Эффективность включения антибактериального препарата в ниосомы составила  $76,1 \pm 1,7\%$ , Индекс полидисперсности препаратов равнялся 0,19.

### 2.2.2. Определение скорости высвобождения антибактериальных препаратов из ниосом *in vitro*

Для определения скорости высвобождения антибактериальных препаратов из ниосом *in vitro* 1 мл очищенной ниосомальной дисперсии с инкапсулированным антибактериальным препаратом помещали в диализный мешок (10-14 кДа, ширина 10 мм), который в свою очередь, переносили в химический стакан, содержащий 100 мл 0,01 М фосфатно-солевого буфера (pH=7,2-7,4). Раствор с погруженным диализным мешком перемешивали на магнитной мешалке при  $(37 \pm 1)$  °С. Образцы раствора отбирали через один, два, четыре, шесть, двадцать четыре часа. Анализируемый раствор перед анализом разбавляли в десять раз раствором 0,02 М раствора ацетата аммония (pH=4,7) и фильтровали через PVDF фильтр с размером пор 0,2 мкм. Концентрацию антибактериальных препаратов определяли методом обращенно-фазной ВЭЖХ в изократическом режиме элюирования (патент на изобретение РФ № 2754850 от 20.07.2020 г.). Динамику высвобождения лекарственного вещества коррелировали с уменьшением эффективности включения препарата в ниосомы. В ходе анализа использовали хроматографическую колонку C18 250×3 мм, размер частиц 5 мкм. Подвижная фаза – смесь 0,02 М раствора ацетата аммония (pH=4,7) с ацетонитрилом в соотношении 90:10. Детекцию осуществляли ультрафиолетовым детектором при длине волны 252 нм. Объем вводимой пробы 10 мкл. Определение скорости высвобождения антибактериальных препаратов из ниосомальных везикул *in vitro* представлена в таблице 9.

Таблица 9 – Определение скорости высвобождения антибактериальных препаратов из ниосомальных везикул *in vitro*

Показатели	Время диализа против фосфатного буфера, ч							
	0	1	2,5	4	5	10	15	24
Эффективность включения, %	Состав ниосом Span 60-CH-ПЭГ-DCP-цефотаксим							
	63,70± ±1,20	61,00± ±1,90	60,50± ±2,20	27,22± ±1,36*	25,08± ±1,25	21,64± ±1,08	19,90± ±1,00*	15,50± ±0,80*
	Состав ниосом Span 60-CH-ПЭГ-DCP-офлоксацин							
	76,10± ±1,70	72,80± ±3,20	68,10± ±3,40*	55,5± ±2,78*	46,40± ±2,30*	28,00± ±1,40*	14,40± ±0,70*	8,60± ±0,50*
Состав ниосом Span 60-CH-ПЭГ-DCP-гентамицин								
67,80± ±1,10	63,50± ±3,20	50,00± ±2,80*	21,30± ±1,07*	20,16± ±1,01	15,50± ±1,00*	12,60± ±0,80*	10,70± ±0,60*	

Примечание: \*  $p \leq 0,05$  – разница статистически достоверна в сравнении с фоновыми показателями

Согласно полученным данным высвобождение действующих веществ из ниосомальных частиц происходит неравномерно. Высвобождение цефотаксима из ниосом наиболее интенсивно происходило в первые 4 часа. В этот период наблюдалось снижение исходного количества инкапсулированного антибиотика на 60-70%. Спустя 24 часа диализа ниосомы сохраняли 20-24% действующего вещества от исходного количества. Кроме того, скорость высвобождения цефотаксима в раствор уменьшалась с увеличением доли холестерина относительно Span 60. Наиболее интенсивно в указанных условиях процесс протекает первые 5 часов для офлоксацина, в этот период происходит высвобождение порядка 60-65% от исходного количества инкапсулированного антибактериального препарата. Спустя 24 часа диализа ниосомы сохраняли 10-12% от исходного количества инкапсулята. Высвобождение гентамицина из ниосомальных везикул наиболее интенсивно происходило в первые 4 часа. В этот период фиксировалось высвобождение 70-75% от исходного количества инкапсулированного антибиотика. Спустя 24 часа диализа ниосомы сохраняли 12-16% от исходного количества инкапсулята.

Таким образом, интенсивное высвобождение антибактериальных препаратов из ниосомальных везикул *in vitro* регистрировалось в первые 4-5 часов диализа, а через 24 часа исследования наблюдалось снижение высвобождения препаратов до 10-15%.

### 2.2.3. Изучение стабильности ниосомальных форм антибактериальных препаратов в процессе хранения

В процессе хранения стабильность везикул может претерпевать некоторые изменения, за счет частичной деструкции частиц ниосомальных форм, соответственно – снижаться эффективность включения антибактериальных препаратов.

#### 2.2.3.1. Изучение стабильности ниосомальной формы цефотаксима

Исходная эффективность включения в готовых препаратах, содержащих ниосомы на основе Span 60, способствовала накоплению в носителе  $63,70 \pm 1,20$  % цефотаксима. Полученные в опыте данные позволяют сделать вывод, что остаточное количество цефотаксима в исследованных модельных препаратах в течение 30 сут. хранения при температуре  $4 \pm 2$  °C изменяется незначительно. Стабильность ниосомальной формы цефотаксима при хранении представлена в таблице 10.

Таблица 10 – Стабильность ниосомальной формы цефотаксима при хранении

№ п/п	Срок хранения, дни	Средний размер, нм		Эффективность включения, %	
		4±2 °C	22±2 °C	4±2 °C	22±2 °C
1	0	274,50±5,50	274,50±5,90	63,70±1,20	63,70±1,20
2	15	280,00±5,90	282,20±6,80	63,00±2,20	60,20±3,50
3	30	282,10±6,20	285,50±7,20	62,80±2,90	58,10±3,30
4	45	283,30±6,50	287,70±7,60	60,50±3,30	56,60±3,00*
5	60	284,00±6,80	288,00±8,80	59,70±3,60	52,30±2,60*
6	75	284,50±7,10	290,80±8,90	59,20±2,50	50,00±3,00*
7	90	286,10±7,60	293,20±10,30	58,40±3,00*	48,10±2,40*
8	105	286,80±7,40	294,90±10,90	56,60±2,80*	46,30±2,90*
9	120	287,00±7,70	295,40±11,50	55,30±2,20*	45,50±2,70*
10	135	290,20±8,00	300,00±12,20*	53,80±3,30*	43,70±3,00*
11	150	292,00±8,30	303,30±14,90*	51,70±4,10*	43,10±2,50*
12	165	293,10±8,70*	306,20±15,50*	51,40±2,70*	42,80±2,00*
13	180	295,20±8,80*	310,60±16,80*	50,90±2,50*	41,30±1,90*

Примечание: \*  $p \leq 0,05$  – разница статистически достоверна в сравнении с фоновыми показателями.

По истечении 6 месяцев времени хранения при температуре  $4\pm 2^\circ\text{C}$  отмечалась стабильность ниосомальных форм, что позволяло сохранить до 80% инкапсулированного в них цефотаксима относительно исходного значения. Установлено, что при хранении при температуре ( $22\pm 2^\circ\text{C}$ ) ниосомы могут терять до 35% включенного в ниосомы цефотаксима в течение 6 месяцев, при незначительном изменении средних размеров частиц (до 12%).

### 2.2.3.2. Изучение стабильности ниосомальной формы офлоксацина

Исходная эффективность включения офлоксацина в ниосомальную форму, содержащую ниосомы на основе Span 60, составила  $76,1\pm 4,6\%$ . Стабильность ниосомальной формы офлоксацина при хранении представлена в таблице 11.

Таблица 11 – Стабильность ниосомальной формы офлоксацина при хранении

№ п/п	Срок хранения, дни	Средний размер, нм		Эффективность включения, %	
		$4\pm 2^\circ\text{C}$	$22\pm 2^\circ\text{C}$	$4\pm 2^\circ\text{C}$	$22\pm 2^\circ\text{C}$
1	0	$245,00\pm 4,80$	$245,00\pm 5,00$	$76,10\pm 4,60$	$76,10\pm 4,40$
2	15	$250,50\pm 5,10$	$260,20\pm 18,30$	$75,80\pm 3,80$	$72,90\pm 4,00$
3	30	$250,90\pm 5,40$	$260,50\pm 19,00$	$73,60\pm 4,40$	$68,80\pm 4,13$
4	45	$251,20\pm 5,60$	$260,60\pm 18,10$	$72,30\pm 3,80$	$63,20\pm 3,48^*$
5	60	$251,50\pm 6,00$	$260,80\pm 20,90$	$70,40\pm 3,52$	$60,60\pm 3,60^*$
6	75	$250,40\pm 6,30$	$260,90\pm 18,40$	$69,95\pm 3,85$	$54,30\pm 3,30^*$
7	90	$260,30\pm 6,60$	$270,00\pm 16,10$	$68,67\pm 3,43$	$53,80\pm 2,50^*$
8	105	$261,10\pm 6,80$	$277,50\pm 13,90^*$	$67,21\pm 4,03$	$52,70\pm 3,20^*$
9	120	$261,80\pm 7,20$	$284,20\pm 14,50^*$	$67,00\pm 3,35$	$52,50\pm 3,00^*$
10	135	$262,50\pm 7,30$	$291,60\pm 17,70^*$	$66,80\pm 4,00^*$	$52,00\pm 2,80^*$
11	150	$262,60\pm 7,50$	$292,00\pm 15,00^*$	$66,17\pm 3,97^*$	$51,40\pm 5,00^*$
12	165	$262,80\pm 7,70$	$300,30\pm 18,20^*$	$65,92\pm 4,00^*$	$51,90\pm 3,10^*$
13	180	$263,40\pm 8,00^*$	$307,70\pm 16,40^*$	$65,10\pm 3,25^*$	$50,50\pm 2,50^*$

\*  $p \leq 0,05$  – разница статистически достоверна в сравнении с фоновыми показателями

Во время хранения ниосомальной формы офлоксацина при температуре  $4\pm 2^\circ\text{C}$  в течение 6 месяцев отмечалось незначительное увеличение размеров ниосомальных везикул (до 7,0%) и сохранение до 85,6% инкапсулированного в ниосомы офлоксацина относительно исходного значения. Хранение при температуре  $22\pm 2^\circ\text{C}$  сопровождается потерей ниосомами до 33% включенного вещества в течение 6 месяцев при незначительном изменении размеров частиц (до 20%). Учитывая этот факт, был сделан вывод о том, что предпочтительным является кратковременное хранение ниосомальной формы офлоксацина при температуре  $4\pm 2^\circ\text{C}$ .

### 2.2.3.3. Изучение стабильности ниосомальной формы гентамицина

Исходная эффективность включения гентамицина в ниосомальную форму, содержащую ниосомы на основе Span 60, составила  $67,8 \pm 1,1$  %. Стабильность ниосомальной формы гентамицина при хранении представлена в таблице 12.

Таблица 12 – Стабильность ниосомальной формы гентамицина при хранении

№ п/п	Срок хранения, дни	Средний размер, нм		Эффективность включения, %	
		(4±2) °C	(22±2) °C	(4±2) °C	(22±2) °C
1	0	255,80±8,00	255,80±8,80	67,80±1,10	67,80±1,10
2	15	263,40±8,60	270,20±14,20	67,20±2,90	62,00±3,70
3	30	281,80±15,20	285,30±16,10	66,60±4,00	58,40±3,00*
4	45	283,30±17,00	286,60±14,80	65,90±3,30	55,70±3,30*
5	60	283,60±16,20	288,70±17,40	64,60±3,70	51,90±2,60*
6	75	284,00±14,60	290,40±16,70*	64,00±3,20	47,00±2,40*
7	90	285,90±16,80	292,70±17,90*	63,30±3,90	44,90±2,20*
8	105	286,20±15,50	294,50±15,00*	61,50±3,50*	40,60±2,00*
9	120	287,70±14,40	298,10±17,70*	58,80±2,90*	38,80±2,30*
10	135	288,30±17,30	302,00±18,00*	55,20±3,00*	36,00±1,80*
11	150	290,00±16,80*	305,40±18,10*	54,60±2,70*	33,70±2,00*
12	165	290,90±15,60*	308,80±15,50*	54,00±3,20*	31,50±1,60*
13	180	291,50±14,30*	315,60±19,00*	52,80±2,80*	29,60±1,50*

\*  $p \leq 0,05$  – разница статистически достоверна в сравнении с фоновыми показателями

У ниосомальной формы гентамицина при температуре  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  в течение 6 месяцев отмечалось незначительное увеличение размеров ниосомальных везикул (до 12,0%) и сохранение до 78,0% инкапсулированного в ниосомы гентамицина относительно исходного значения.

Таким образом, предпочтительным является хранение ниосомальных форм антибактериальных препаратов при температуре  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  в течение 6 месяцев. Следует отметить, что динамика изменения показателей качества ниосомальных дисперсий в большой степени зависит от природы включаемой в ниосомы субстанции. В частности, скорость высвобождения из ниосом высокомолекулярных биологически активных веществ (например белков, нуклеиновых кислот) и гидрофобных соединений при хранении, как правило, значительно меньше по сравнению с гидрофильными и низкомолекулярными веществами.

### 2.2.4. Токсикологическая оценка ниосомальных форм антибактериальных препаратов

#### 2.2.4.1. Определение острой токсичности ниосомальных форм антибактериальных препаратов

Для определения острой токсичности ниосомальных форм антибактериальных препаратов были проведены опыты на лабораторных животных (крысах и мышах).

Подбирали животных в группы по пять самцов и пять самок с идентичной массой тела, которая составляла 200-220 г у крыс и 18-22 г у мышей. Ниосомальные формы цефотаксима, офлоксацина, гентамицина вводили однократно внутрижелудочно при помощи зонда, животным контрольных групп вводили соответствующие объемы физиологического раствора. Лабораторные животные содержались на стандартном рационе. В течение двух недель проводилось изучение данных показателей: качества шерстного покрова, цвета видимых слизистых оболочек, обращение к корму и воде, подвижности, изменения массы тела, ритма и частоты дыхательных движений, количества сердечных сокращений, оценивали тяжесть и характер возможной интоксикации, ее обратимость, фиксировали сроки гибели. Параметры острой токсичности ниосомальных форм антибактериальных препаратов представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Параметры острой токсичности ниосомальных форм антибактериальных препаратов, мг/кг

Ниосомальная форма	Вид животных	Параметры токсичности					SLD <sub>50</sub>
		МПД	LD <sub>16</sub>	LD <sub>50</sub>	LD <sub>84</sub>	LD <sub>100</sub>	
Цефотаксима	Белые мыши	5000,00	5666,67	7000,00	8333,33	9000,00	±53,33
	Белые крысы	5000,00	6636,36	7600,00	8438,60	9000,00	±36,05
Офлоксацина	Белые мыши	5000,00	5428,57	5950,00	6571,43	7000,00	±22,86
	Белые крысы	5000,00	5684,21	6250,00	6719,30	7000,00	±20,70
Гентамицина	Белые мыши	4500,00	4928,57	5550,00	6071,43	6500,00	±22,86
	Белые крысы	4500,00	5184,21	5750,00	6219,30	6500,00	±20,70

LD<sub>50</sub> при внутрижелудочном введении ниосомального цефотаксима для мышей и крыс составил 7000±53,33 и 7600±36,05 мг/кг соответственно.

LD<sub>50</sub> при внутрижелудочном введении ниосомальной формы офлоксацина для мышей и крыс составил 5950,00±22,86 мг/кг и 6250,00±20,70 мг/кг соответственно.

LD<sub>50</sub> при внутрижелудочном введении ниосомальной формы гентамицина для мышей и крыс составил 5550,00±22,86 и 5750,00±20,70 мг/кг соответственно.

Таким образом, ниосомальные формы цефотаксима, офлоксацина, гентамицина согласно ГОСТ 12.1.007-76 по средней смертельной дозе при введении в желудок белым мышам и крысам относятся к 4 классу опасности: вещества малоопасные.

#### **2.2.4.2. Изучение кумуляции методом определения субхронической токсичности**

Оценка кумуляции цефотаксима, офлоксацина, гентамицина у крыс методом определения субхронической токсичности ниосомальной формы позволила оценить не только кумулятивные свойства, но и возможность привыкания. На протяжении 24 дней животным первой группы вводили через зонд ниосомальную форму цефотаксима, офлоксацина, или гентамицина второй группе в идентичных дозах вводили стерильный физиологический раствор. С 1 по 4 день крысам вводили разработанные лекарственные формы в дозе 0,1 от LD<sub>50</sub>; с 5 по 8 день в дозе 0,15 от LD<sub>50</sub>; с 9 по 12 день в дозе 0,22 от LD<sub>50</sub>; с 13 по 16 день в дозе 0,34 от LD<sub>50</sub>; с 17 по 20 день в дозе 0,5 от LD<sub>50</sub>; с 21 по 24 день в дозе 0,75 от LD<sub>50</sub>. Крысам контрольных групп вводили идентичные объемы физиологического раствора. При проведении исследования отмечали изменения в клинических показателях, проводили взвешивание, учитывали падеж животных, вычисляли коэффициент кумуляции. Для ниосомальной формы цефотаксима коэффициент кумуляции составил 8,24; для ниосомальной формы гентамицина 5,23; для ниосомальной формы офлоксацина 6,74. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ниосомальные формы цефотаксима,

офлоксацина, гентамицина относятся по степени кумуляции к 4 группе (по Л. Н. Медведю, 1964) то есть к веществам со слабо выраженной кумуляцией.

#### **2.2.4.3. Определение аллергизирующих свойств**

При проведении эксперимента подбирались здоровые кролики с массой тела 3,0–3,3 кг по 10 животных, с чистыми кожными покровами. На первом этапе проводилось исследование местно-раздражающего действия ниосомальных форм антибактериальных препаратов на кожу кроликов. Измеряли толщину кожи после нанесения каждой разработанной антибактериальной формы, обследовали выстриженные участки кожи и местную температуру, определяли наличие болезненности при пальпации через полчаса, 1, 3, 6, 12 часов и через сутки. При проведении исследования не регистрировалось наличие таких показателей как: гиперемия, инфильтрация и отек кожи, десквамации эпителия, а также общая токсическая реакция.

На втором этапе проводилась конъюнктивальная проба. Для этого одну каплю ниосомальной формы содержащую исследуемые вещества инстиллировали под верхнее веко животного, во второй глаз аналогично наносили каплю физиологического раствора. После этого веки соединяли и держали в течение нескольких секунд. Результаты регистрировали через пятнадцать минут (быстрая реакция), тридцать минут, 1, 2, 3, 4, 5, 6 часов, а также через 1-2 суток (замедленного типа) по следующим параметрам: гиперемия конъюнктивы, роговицы, отек век и экскреция слезных желез. После инстилляции животным ниосомальной формы цефотаксима, офлоксацина или гентамицина было отмечено, что в течение первых минут проявлялось беспокойство, однако при осмотре конъюнктивы, роговицы и век у кроликов раздражение не отмечалось. В результате проведения осмотра, термометрии, подсчета пульса и количества дыхательных движений отклонений от нормы также не выявлено.

Таким образом, проведенные эксперименты доказывают отсутствие у ниосомальных форм цефотаксима, офлоксацина, гентамицина местно-раздражающего и аллергизирующего действий, что позволяет отнести к классу веществ, не проявляющих раздражающего действия.

#### **2.2.5. Изучение взаимодействия ниосом с модифицированными фармакокинетическими параметрами с компонентами крови, участвующими в процессе доставки действующих веществ**

Установлено, что ниосомальные частицы достаточно хорошо окрашиваются анилиновыми, ядерными и оксифильными красителями (Ковалева Н. И. и др., 2015).

На первом этапе исследований проводили подбор, оптимизацию методов фиксации и окрашивания ниосом в клетках крови. Были апробированы различные фиксаторы, используемые в лабораторных методах исследования. В результате проведенных экспериментов установлено, что наиболее оптимальным методом фиксации ниосом являлась инкубация мазков, полученных из периферической крови, после добавления гепарина и инкубации, в 96 % этиловом спирте – 5 минут.

Для визуализации ниосом использовали смешанную культуру лейкоцитов. В стабилизированную суспензию лейкоцитов вносили окрашенные сафранином ниосомальные везикулы и инкубировали при 37 °С в течение 20 мин.

Из осадка на предметном стекле делали мазок, высушивали на воздухе, фиксировали в этиловом спирте. Клетки крови дифференцировали докрашивая ядра азуром II в течение 5 минут, при комнатной температуре. При микроскопии мазков внутри нейтрофильных гранулоцитов выявляли окрашенные ниосомы округлой формы (рисунок 7).



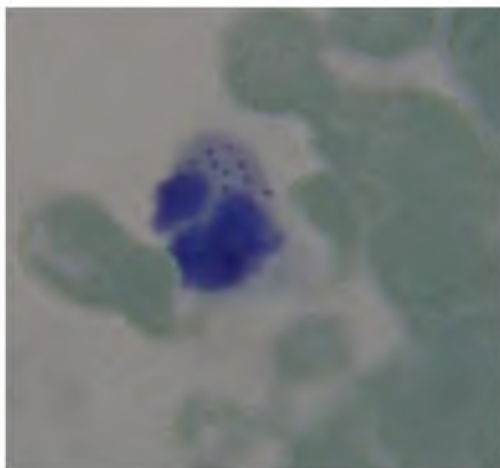


Рисунок 7 – Ниосомальные везикулы в цитоплазме нейтрофильного гранулоцита.  
Ув X 1000

Целью дальнейших исследований было определение оптимальной методики визуализации ниосомальных везикул методом растровой (сканирующей) электронной микроскопии в плазме крови.

Плазму крови получали от крыс, с массой тела 250–300 г по методу Кондратова и др., 2016. После размораживания 1 мл образцов плазмы крови крысы центрифугировали в течение 10 мин при 5000 оборотах для удаления возможных остатков клеточного детрита.

Затем супернатанты переносили в новые пробирки и центрифугировали в течение 10 мин при 16000 оборотах. В качестве подложки использовали углеродные пленки, на которые наносили предварительно разбавленную деионизированной водой суспензию ниосом и полученный супернатант. После подсушивания при комнатной температуре происходит адгезия с поверхности пленки. Поэтому мы микроскопировали не окрашенные ниосомы, без напыления.

В результате проведенных экспериментов установлено наличие субпопуляций ниосомальных везикул, достигающих диаметра 500 – 900 нм (рисунок 8). Нами выявлено, что в одном поле зрения плазмы крови имеются от 25 до 30 субпопуляций ниосом округлой формы размером около 800 нм.

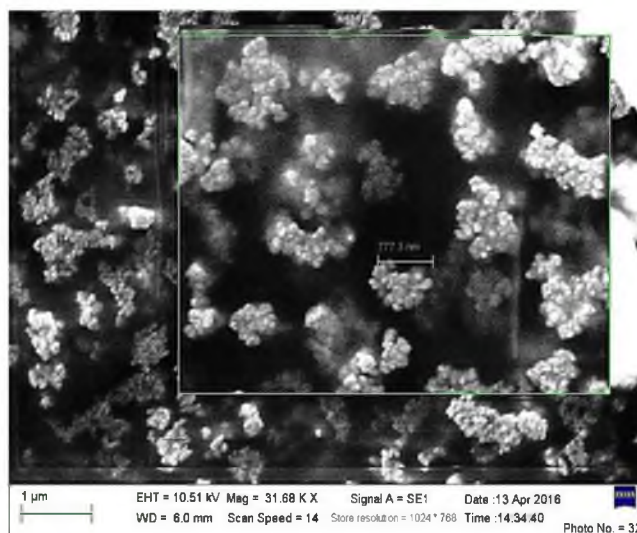


Рисунок 8 – Ниосомы без напыления, на углеродной подложке. Ув X 31680

Исследования по определению фармакокинетических параметров ниосомальных форм антибактериальных форм проводили на мышах. Через 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4 и 5 часов после введения препаратов брали образцы, затем обрабатывали 30% по объему трифторуксусной кислотой и центрифугировали. Супернатант использовали в качестве образца для проведения ВЭЖХ по методике А. Н. Куличенко, М. Е. Михайловой и др. (2014).

В результате исследования, максимальная концентрация  $8,6 \pm 0,52$  мкг/мл цефотаксима в составе ниосомальных везикул регистрировалась через 1-1,5 часа после введения. Время полувыведения ниосомальной формы цефотаксима составило 22 часа. Данный эффект способен предотвратить развитие резистентных штаммов бактерий в организме инфицированных животных.

В составе ниосомальных везикул офлоксацин регистрировался в максимальной концентрации  $5,23 \pm 0,31$  мкг/мл через 4-4,5 часа после введения. Время полувыведения ниосомальной формы офлоксацина составило 24 часа. Данные параметры подтверждают модифицированную скорость высвобождения действующего вещества, которая способствует пролонгированному влиянию на организм антибактериального препарата.

Анализ фармакокинетических параметров гентамицина позволил установить, что максимальная концентрация  $5,05 \pm 0,25$  мкг/мл антибиотика в составе ниосомальных везикул регистрировалась через 120 минут. Наблюдалось увеличение времени полувыведения антибиотика до 20 часов.

Таким образом, установлено взаимодействие ниосомальных везикул с лейкоцитами, где они представлены в единичных экземплярах, а также в плазме крови ниосомы представлены в виде субпопуляций.

Данные фармакокинетические параметры ниосомальных форм антибактериальных препаратов свидетельствуют об изменениях в их биораспределении, включающем: увеличение времени достижения концентрации в плазме крови, снижение максимальной концентрации, увеличение времени полувыведения действующих веществ из организма.

#### **2.2.6. Определение чувствительности *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* к различным формам антибактериальных препаратов**

Бактерицидное действие антибактериальных препаратов зависит не от максимальной концентрации их в сыворотке крови, а от длительности периода поддержания уровня концентрации выше уровня минимальной ингибирующей концентрации для данного возбудителя. Поэтому для получения антибактериального эффекта достаточно поддержания максимальной концентрации на уровне 2–4-кратных значений минимальной ингибирующей концентрации (Ворошилова Т. М., Родионов Г. Г., Филиппова Ю. Н., Афиногенова А. Г., 2015).

##### **2.2.6.1. Определение чувствительности *Staphylococcus aureus* к свободным и ниосомальным формам антибактериальных препаратов**

Целью дальнейшего исследования явилось определение чувствительности к антибактериальным препаратам в свободной, ниосомальной формах патогенных стафилококков. Выявили, что у ниосомальной формы офлоксацина высокие показатели ингибирования роста различных штаммов *Staphylococcus aureus*, диаметр зоны задержки роста при использовании ниосомальной формы офлоксацина колебался в пределах  $29,9 \pm 1,31$  мм для штамма 201108, от  $24,3 \pm 1,46$  мм для штамма ВКПМ В-6646,

у свободной формы офлоксацина диаметр зоны задержки роста составил в пределах  $27,2 \pm 1,63$  мм для первого штамма,  $22,6 \pm 1,13$  мм для второго штамма. Ниосомальная форма цефотаксима способствовала проявлению высоких показателей ингибирования роста различных штаммов *Staphylococcus aureus*, диаметр зоны задержки роста колебался в пределах  $31,4 \pm 1,88$  мм для штамма 201108, для штамма ВКПМ В-6646 –  $25,9 \pm 1,60$  мм, у свободной формы цефотаксима диаметр зоны задержки роста составил в пределах  $28,0 \pm 1,54$  мм для первого штамма,  $24,1 \pm 1,22$  мм для второго штамма. При определении ингибирования роста различных штаммов *Staphylococcus aureus* ниосомальной формой гентамицина диаметр зоны задержки роста колебался в пределах  $26,8 \pm 1,34$  мм для штамма 201108,  $21,1 \pm 1,10$  мм для штамма ВКПМ В-6646, у свободной формы гентамицина диаметр составил в пределах  $25,2 \pm 1,26$  мм для первого штамма,  $20,6 \pm 1,03$  мм для второго штамма. При определении чувствительности к различным штаммам *Staphylococcus aureus* свободных и ниосомальных антибактериальных форм, разницы в показателях ингибирования роста микроорганизмов выявлены не были.

#### **2.2.6.2. Определение чувствительности *Pseudomonas aeruginosa* к свободным и ниосомальным формам антибактериальных препаратов**

Целью данного этапа работы является изучение чувствительности культур *Pseudomonas aeruginosa* к свободным и разработанным лекарственным формам. У ниосомальной формы офлоксацина преобладали высокие показатели ингибирования роста различных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, диаметр зоны задержки роста при использовании ниосомальной формы офлоксацина колебался в пределах  $28,0 \pm 1,68$  мм для штамма 190158,  $23,3 \pm 1,17$  мм для штамма ВКПМ В-8243, у свободной формы офлоксацина диаметр зоны задержки роста составил в пределах  $26,6 \pm 1,33$  мм для первого штамма,  $21,9 \pm 1,20$  мм для второго штамма. Ниосомальная форма цефотаксима способствовала проявлению ингибирования роста различных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, диаметр зоны задержки роста колебался в пределах  $29,3 \pm 1,76$  мм для штамма 190158, для штамма ВКПМ В-8243  $24,6 \pm 1,35$  мм, у свободной формы цефотаксима диаметр зоны задержки роста составил в пределах  $27,2 \pm 1,49$  мм для первого штамма,  $23,8 \pm 1,43$  мм для второго штамма. При определении ингибирования роста различных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* ниосомальной формой гентамицина диаметр зоны задержки роста колебался в пределах  $25,8 \pm 1,43$  мм для штамма 190158,  $20,2 \pm 1,11$  мм для штамма ВКПМ В-8243, у свободной формы гентамицина диаметр составил в пределах  $24,4 \pm 1,22$  мм для первого штамма,  $19,5 \pm 1,07$  мм для второго штамма. При определении чувствительности к различным штаммам *Pseudomonas aeruginosa* свободных и ниосомальных антибактериальных форм, разницы в показателях ингибирования роста микроорганизмов выявлены не были.

#### **2.2.7. Определение минимальной подавляющей и минимальной бактерицидной концентрации антибактериальных препаратов ниосомальных форм в отношении *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa***

Для выявления количественных характеристик антимикробного спектра ниосомальных форм антибактериальных препаратов мы определили минимальную подавляющую и минимальную бактерицидную концентрации в отношении *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. Уровни МПК и МБК свободных и ниосомальных лекарственных форм антибактериальных препаратов в тесте серийных разведений в мясо-пептонном бульоне представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Уровни МПК И МБК свободных и ниосомальных лекарственных форм антибактериальных препаратов в тесте серийных разведений в мясо-пептонном бульоне, мкг/мл

Исследуемые штаммы	Staphylococcus aureus штамм 201108		Pseudomonas aeruginosa штамм 190158	
	МПК	МБК	МПК	МБК
Офлоксацин свобод.	1,0 ±0,05	2,5±0,15	2,8±0,14	3,5±0,4
Офлоксацин нисомал.	0,5±0,1*	1,3±0,07*	1,8±0,11*	2,2±0,13*
Гентамицин свобод.	2,5 ±0,13	4,2±0,21	3,4±0,2	5,8±0,35
Гентамицин нисомал.	1,1±0,06*	2,6±0,13*	2,0 ±0,1*	3,0±0,2*
Цефотаксим свобод.	4,0 ±0,22	5,5±0,28	4,9±0,25	6,8±0,41
Цефотаксим нисомал.	2,3±0,12*	3,3±0,2*	3,0±0,15*	3,5±0,15*

*Примечание:* \*  $p \leq 0,05$  – разница статистически достоверна в сравнении с показателями свободных форм антибактериальных препаратов

Для *Staphylococcus aureus* штамм 201108 уровень минимальной подавляющей концентрации у ниосомальной формы цефотаксима составил 2,3±0,12 мкг/мл, ниосомальной формы офлоксацина – 0,5±0,1 мкг/мл, ниосомальной формы гентамицина 1,1±0,06 мкг/мл; уровень минимальной бактерицидной концентрации у ниосомальной формы цефотаксима составил 3,3±0,2 мкг/мл, ниосомальной формы офлоксацина – 1,3±0,07 мкг/мл, ниосомальной формы гентамицина 2,6±0,13 мкг/мл. Для *Pseudomonas aeruginosa* штамм 190158 уровень МПК у ниосомальной формы цефотаксима составил 3,0±0,15 мкг/мл, ниосомальной формы офлоксацина – 1,8±0,11 мкг/мл, ниосомальной формы гентамицина 2,0±0,1 мкг/мл, уровень МБК у ниосомальной формы цефотаксима составил 3,5±0,15 мкг/мл, ниосомальной формы офлоксацина – 2,2±0,13 мкг/мл, ниосомальной формы гентамицина 3,0±0,2 мкг/мл. Таким образом, значения минимальных подавляющих концентраций и минимальных бактерицидных концентраций антибактериальных препаратов в составе ниосомальных лекарственных форм были в целом сопоставимы и не противоречили основным механизмам действия включенных антибиотиков.

#### 2.2.8. Расчет терапевтических доз ниосомальных форм антибактериальных препаратов для лабораторных животных

Для определения терапевтических доз ниосомальных форм антибактериальных препаратов (проводили в соответствии с методиками Р. У. Хабриева, 2005; А. Н. Миронова, 2012), моделировали интраперитонеальный стафилококковый инфекционный процесс (патент №2723745) у белых мышей внутрибрюшинным введением 0,8 мл суточной культуры *Staphylococcus aureus* в концентрации  $10^8$  млн. микробных тел в 1 мл, а также внутрибрюшинный синегнойный инфекционный процесс (патент №2725136) у белых мышей внутрибрюшинным введением 0,8 мл суточной культуры *Pseudomonas aeruginosa* в концентрации  $10^8$  млн. микробных тел в 1 мл. Проводился учет выживаемости мышей через один, три, шесть, двенадцать, двадцать четыре, сорок восемь часов, затем с 3 по 15 сутки после индуцирования процесса, получавших лечение в сравнении с контрольными. Ниосомальные и свободные лекарственные формы антибактериальных препаратов вводили однократно, внутримышечно.

Для определения терапевтических доз при стафилококковой инфекции белым мышам вводили из расчета по действующему веществу свободную форму цефотаксима первой группе – 15,0 мг/кг; ниосомальную форму второй группе из расчета – 5,0 мг/кг;

третьей – 7,5 мг/кг; четвертой – 15,0 мг/кг массы тела. Также для определения терапевтических доз цефотаксима при синегнойной инфекции белым мышам свободную и ниосомальные формы вводили аналогично предыдущему исследованию. Таким образом, в первые сутки исследования, в группах, где вводилась свободная форма цефотаксима наблюдалась 70-75 %-ная выживаемость мышей, во-вторых, группах 65-70%, а в-третьих, и четвертых 100% выживаемость. Данный результат объясним фармакокинетическими особенностями действующего вещества в различных формах, поступивших в организм. Так, при внутримышечном введении лабораторным животным, зараженным синегнойной палочкой свободной формы цефотаксима определяли концентрацию антибиотика в плазме крови через 60 минут после его введения и она составляла  $12,5 \pm 0,15$  мкг/мл; в печени –  $5,6 \pm 0,28$  мкг/мл; в почках  $1,75 \pm 0,08$  мкг/мл, в сердце –  $1,0 \pm 0,05$  мкг/мл; в легких наименьшее содержание цефотаксима  $0,75 \pm 0,04$  мкг/мл; во второй группе концентрация антибиотика в плазме крови составляла  $2,0 \pm 0,1$  мкг/мл; в печени –  $1,1 \pm 0,06$  мкг/мл; в почках  $0,8 \pm 0,04$  мкг/мл, в сердце –  $0,5 \pm 0,03$  мкг/мл; в легких  $0,3 \pm 0,2$  мкг/мл; в третьей группе концентрация цефотаксима в плазме крови через 60 минут после его введения составляла  $6,25 \pm 0,31$  мкг/мл; в печени –  $4,8 \pm 0,24$  мкг/мл; в почках  $3,05 \pm 0,15$  мкг/мл, в сердце –  $2,86 \pm 0,17$  мкг/мл; в легких  $2,51 \pm 0,15$  мкг/мл; в четвертой группе концентрация антибиотика в плазме крови через 60 минут после его введения  $8,6 \pm 0,52$  мкг/мл; в печени –  $6,2 \pm 0,37$  мкг/мл; в почках  $4,4 \pm 0,26$  мкг/мл, в сердце –  $4,08 \pm 0,2$  мкг/мл; в легких  $3,75 \pm 0,18$  мкг/мл.

Для определения терапевтических доз офлоксацина при стафилококковой инфекции белых мышей вводили из расчета по действующему веществу свободную форму первой группе 10,0 мг/кг; ниосомальную форму второй группе из расчета 3,5 мг/кг; третьей – 5,0; четвертой – 10,0 мг/кг массы тела соответственно. Также для определения терапевтических доз офлоксацина при синегнойной инфекции белых мышей свободную и ниосомальные формы вводили идентично предыдущему исследованию. Таким образом, в первые сутки исследования, в группах, где вводилась свободная форма офлоксацина наблюдалась 70-80 %-ная выживаемость мышей, во вторых группах 70-75%, а в третьих и четвертых 100% выживаемость. Данный результат объясним фармакокинетическими особенностями действующего вещества в различных формах, поступивших в организм. Так, при внутримышечном введении лабораторным животным, зараженным синегнойной палочкой свободной формы офлоксацина определяли концентрацию антибиотика в плазме крови через 60 минут после его введения и она составляла  $7,55 \pm 0,38$  мкг/мл; в печени –  $4,3 \pm 0,22$  мкг/мл; в почках  $1,06 \pm 0,05$  мкг/мл, в сердце –  $0,77 \pm 0,04$  мкг/мл; в легких  $0,41 \pm 0,02$  мкг/мл; во второй группе концентрация антибактериального препарата в плазме крови составляла через 240 минут после его введения  $1,52 \pm 0,1$  мкг/мл; в печени –  $0,9 \pm 0,05$  мкг/мл; в почках  $0,5 \pm 0,03$  мкг/мл, в сердце –  $0,2 \pm 0,001$  мкг/мл; в легких  $0,15 \pm 0,008$  мкг/мл; в третьей группе концентрация офлоксацина в плазме крови через 240 минут после его введения составляла  $3,82 \pm 0,19$  мкг/мл; в печени –  $2,77 \pm 0,14$  мкг/мл; в почках  $1,88 \pm 0,09$  мкг/мл, в сердце –  $1,62 \pm 0,1$  мкг/мл; в легких  $1,4 \pm 0,08$  мкг/мл; в четвертой группе концентрация антибактериального препарата в плазме крови через 240 минут после его введения  $5,23 \pm 0,31$  мкг/мл; в печени –  $4,11 \pm 0,25$  мкг/мл; в почках  $3,25 \pm 0,16$  мкг/мл, в сердце –  $2,91 \pm 0,15$  мкг/мл; в легких  $2,64 \pm 0,13$  мкг/мл.

Для определения терапевтических доз гентамицина при стафилококковой инфекции белых мышей вводили из расчета по действующему веществу свободную форму первой группе 4,0 мг/кг; ниосомальную форму второй группе из расчета 1,0 мг/кг; третьей – 2,0 мг/кг; четвертой – 4,0 мг/кг массы тела соответственно. Также для определения терапевтических доз гентамицина при синегнойной инфекции белых

мышей свободную и ниосомальные формы вводили идентично предыдущему исследованию. Таким образом, в первые сутки исследования, в группах, где вводилась свободная форма гентамицина наблюдалась 65-70 %-ная выживаемость мышей, во вторых группах 60-70%, а в третьих и четвертых 100% выживаемость. Данный результат объясним фармакокинетическими особенностями действующего вещества в различных формах, поступивших в организм. Так, при внутримышечном введении лабораторным животным, зараженным синегнойной палочкой свободной формы гентамицина определяли концентрацию антибиотика в плазме крови через 60 минут после его введения и она составляла  $5,88 \pm 0,29$  мкг/мл; в печени –  $3,12 \pm 0,16$  мкг/мл; в почках  $2,91 \pm 0,15$  мкг/мл, в сердце –  $0,60 \pm 0,03$  мкг/мл; в легких  $0,41 \pm 0,02$  мкг/мл; во второй группе концентрация антибиотика в плазме крови составляла через 120 минут после его введения  $1,38 \pm 0,07$  мкг/мл; в печени –  $0,72 \pm 0,04$  мкг/мл; в почках  $0,66 \pm 0,03$  мкг/мл, в сердце –  $0,15 \pm 0,008$  мкг/мл; в легких  $0,11 \pm 0,006$  мкг/мл; в третьей группе концентрация офлоксацина в плазме крови через 120 минут после его введения составляла  $3,33 \pm 0,17$  мкг/мл; в печени –  $2,12 \pm 0,11$  мкг/мл; в почках  $1,97 \pm 0,1$  мкг/мл, в сердце –  $1,70 \pm 0,09$  мкг/мл; в легких  $1,66 \pm 0,08$  мкг/мл; в четвертой группе концентрация антибиотика в плазме крови через 120 минут после его введения  $5,05 \pm 0,25$  мкг/мл; в печени –  $2,84 \pm 0,14$  мкг/мл; в почках  $3,11 \pm 0,16$  мкг/мл, в сердце –  $2,63 \pm 0,13$  мкг/мл; в легких  $2,20 \pm 0,11$  мкг/мл.

В группах контроля, где животные не получали лечения – все подопытные погибли в течении 20-24 часов после заражения *Staphylococcus aureus*, а при инфекции, вызванной *Pseudomonas aeruginosa* в группе контроля погибли в течении 12-16 часов после заражения. В третьих и четвертых группах антибактериальные препараты, высвобождаясь из ниосомальных везикул в плазме крови и печени регистрировались в минимальных бактерицидных концентрациях, а в легких, почках и сердце в минимальных подавляющих концентрациях у лабораторных животных с индуцированной внутрибрюшинной синегнойной инфекцией, что способствовало 100% выживаемости животных с индуцированными патологиями.

Исходя из полученных результатов становится возможным сделать вывод о том, что суточная доза, рассчитанная по действующему веществу с учетом данных МБК и МПК, инкапсулированному в ниосомы оказалась меньше в связи с направленным транспортом везикул, но при этом не снижало качества применяемой фармакотерапии.

Оптимальными терапевтическими дозами в результате проведенных исследований следует считать: у ниосомальной формы цефотаксима 7,5 мг/кг массы; у ниосомальной формы офлоксацина 5,0 мг/кг массы тела; у ниосомальной формы гентамицина 2,0 мг/кг массы тела, так как они создают терапевтические концентрации в патологическом очаге организма.

### **2.2.9. Оценка терапевтической эффективности различных форм антибактериальных препаратов при индуцированных инфекционных патологиях лабораторных животных**

Для оценки терапевтической эффективности разработанных форм антибактериальных препаратов нами проведены опыты по моделированию инфекционных процессов на кроликах, вызванных *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. Моделирование инфекционного процесса заключалось в заражении лабораторных животных (кроликов) различной концентрацией микробных клеток. Культуру готовили следующим образом: предварительно засекали с помощью бактериальной петли в пробирки с мясо-пептонным агаром, культивировали ее в термостате при температуре  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  в аэробной среде в течение 24 часов. Ресуспендировали культуру *Staphylococcus aureus* физиологическим раствором.

В стерильной зоне пастеровской пипеткой набирали культуру, довели концентрацию микробных клеток по стандарту мутности Л. А. Тарасевича в стерильной пробирке. После подтверждения патогенности культуры проводили экспериментальное заражение кроликов интраперитонеально в объеме 5 мл, с концентрацией микробных клеток в первой группе в 1 мл до  $10^6$ , во второй в 1 мл до  $10^7$ , в третьей – в 1 мл до  $10^8$ . В группах с высокой концентрацией микробных агентов отмечалось развитие инфекционного процесса, который без терапевтических мероприятий приводил к перитониту и гибели животных.

Опыты длились по 15 дней. Для определения наличия инфекционного процесса в организме лабораторных животных проводили взятие крови для биохимического и гематологического анализа, а также наблюдение за их состоянием и поведением. Для выделения культур и проведения морфологических исследований паренхиматозных органов проводился диагностический убой кроликов на 3 день исследования по 3 животных из каждой группы. Терапию животных начинали, спустя 24 часа после введения культуры *Staphylococcus aureus*, спустя 12 часов после введения культуры *Pseudomonas aeruginosa*, при условии клинического проявления заболевания. В результате гематологического исследования крови установлено, что в первые сутки после введения культур развивалась воспалительная реакция у животных всех исследуемых групп, характеризующаяся увеличением содержания лейкоцитов, гранулоцитов, тромбоцитов, СОЭ. Количество эритроцитов, уровень гемоглобина и гематокрит при этом ниже нормы. При биохимическом исследовании в 1-е сутки после введения культуры *Staphylococcus aureus* отмечалось повышение во всех группах таких показателей, как: АЛТ, АСТ, амилаза, глюкоза, триглицериды, мочевины, креатинин, щелочная фосфатаза, билирубин и снижение уровня общего белка и альбумина.

Для определения терапевтической эффективности цефотаксима при стафилококковой инфекции кроликам второй группы внутримышечно вводили свободную форму (2 раза в сутки) из расчета 15,0 мг/кг; третьей и четвертой вводили ниосомальную форму (1 раз в сутки) в дозах 5,0 и 8,0 мг/кг массы тела соответственно; первая группа была контрольной, лечение не проводилось. Курс лечения длился 5 дней или в зависимости от показателей клинического статуса животных. Длительность заболевания во 2, 3 и 4 группах составила  $8,33 \pm 0,25$ ;  $7,05 \pm 0,29$  и  $5,13 \pm 0,21$  дней соответственно. При синегнойной инфекции кроликам второй группы вводили свободную форму из 15,0 мг/кг (2 раза в сутки); третьей и четвертой вводили ниосомальную форму (1 раз в сутки) в дозах 5,0 и 8,0 мг/кг массы тела соответственно; первая группа была контрольной, лечение не проводилось. Курс лечения длился 7 дней или в зависимости от показателей клинического статуса животных. Длительность заболевания во 2, 3 и 4 группах составила  $12,51 \pm 0,54$ ;  $8,37 \pm 0,32$  и  $7,15 \pm 0,26$  дней соответственно.

Для определения терапевтической эффективности офлоксацина при стафилококковой инфекции кроликам второй группы внутримышечно вводили свободную форму (2 раза в сутки) из расчета 10,0 мг/кг; третьей и четвертой ниосомальную форму (1 раз в сутки) в дозах 2,0 и 5,0 мг/кг массы тела соответственно; первая группа была контрольной, лечение не проводилось. Курс лечения длился 5 дней или в зависимости от показателей клинического статуса животных. Длительность заболевания во 2, 3 и 4 группах составила  $8,60 \pm 0,32$ ;  $7,71 \pm 0,29$  и  $5,47 \pm 0,24$  дней соответственно. При синегнойной инфекции кроликам второй группы также внутримышечно вводили свободную форму (2 раза в сутки) из расчета 10,0 мг/кг; третьей и четвертой ниосомальную форму (1 раз в сутки) в дозах 2,0 и 5,0 мг/кг массы тела соответственно; первая группа была контрольной, лечение не проводилось. Курс лечения длился 7 дней или в зависимости от показателей клинического статуса

животных. Длительность заболевания во 2, 3 и 4 группах составила  $13,24 \pm 0,63$ ;  $9,67 \pm 0,48$  и  $7,33 \pm 0,35$  дней соответственно.

Для определения терапевтической эффективности гентамицина при стафилококковой инфекции кроликам второй группы внутримышечно ввели свободную форму (2 раза в сутки) из расчета 4,0 мг/кг; третьей и четвертой ниосомальную форму (1 раз в сутки) в дозах 2,0 и 4,0 мг/кг массы тела соответственно; первая группа была контрольной, лечение не проводилось. Курс лечения длился 5 дней или в зависимости от показателей клинического статуса животных. Длительность заболевания во 2, 3 и 4 группах составила  $8,87 \pm 0,40$ ;  $7,93 \pm 0,31$  и  $5,62 \pm 0,35$  дней соответственно. При синегнойной инфекции кроликам второй группы также вводили свободную форму из расчета 4 мг/кг; третьей и четвертой вводили ниосомальную форму в дозах 2,0 и 4,0 мг/кг массы тела соответственно; первая группа была контрольной, лечение не проводилось. Курс лечения длился 7 дней или в зависимости от показателей клинического статуса животных. Длительность заболевания во 2, 3 и 4 группах составила  $15,04 \pm 0,74$ ;  $10,25 \pm 0,51$  и  $8,82 \pm 0,47$  дней соответственно.

В результате проведенных исследований выявлено, что в группах, где терапевтические мероприятия не проводились все животные пали от развившегося перитонита в течение 3 дней после заражения. В группах, где применялись ниосомальные формы офлоксацина, цефотаксима или гентамицина наблюдалась 100 % сохранность животных, такие показатели как: температура тела, частота пульса и дыхания в пределах физиологической нормы после перенесенного индуцированного заболевания инфекционной этиологии. Это объясняется этиотропным действием антибактериальных препаратов. Ниосомы доставили действующее вещество в терапевтической дозе в патологический очаг, где происходило его модифицированное высвобождение на протяжении курса антибиотикотерапии.

Внутримышечное введение в ниосомальной форме лабораторным животным в дозах: 5,0 мг/кг офлоксацина; 8,0 мг/кг цефотаксима; 2,0 мг/кг гентамицина при индуцированных внутрибрюшинных инфекционных процессах с различными этиологическими агентами способствовало сокращению длительности заболевания, а соответственно курса лечения, предотвращению появления осложнений.

## **2.2.10. Оценка терапевтической эффективности различных форм антибактериальных препаратов на продуктивных животных**

### ***2.2.10.1. Ретроспективный анализ уровня заболеваемости и надежда сельскохозяйственных животных от незаразных болезней в Ставропольском крае***

Рассмотрение и изучение материалов Управления ветеринарии Ставропольского края по болезням незаразной этиологии сельскохозяйственных животных в хозяйствах и сельхозорганизациях в течение 2020 – 2022 гг. показало, что основными заболеваниями, наносящими значительный экономический ущерб, являются патологии пищеварительной и дыхательной систем. В связи с этими данными были выбраны заболевания дыхательной системы для разработки терапевтических мероприятий, включающих применение ниосомальных форм антибактериальных препаратов.

### ***2.2.10.2. Раскрытие причин возникновения заболеваний дыхательной системы***

Для выявления причин возникновения заболеваний дыхательной системы у телят нами были выбраны животные из нескольких районов: с умеренным климатом – Шпаковский район, ИП «Демченко»; ООО «Колхоз Псынадаха» Кабардино-Балкарской Республики; климатом умеренно-континентальным, район относится к зоне



неустойчивого увлажнения – КФХ Барсук Т.Л. Павловского района, Краснодарского края; климатом, характерным для степей – Туркменский район: сельскохозяйственный производственный кооператив племенной репродуктор «Красный Маныч», сельскохозяйственный производственный кооператив «Владимировский».

В сельскохозяйственных организациях и личных подсобных хозяйствах Ставропольского края, Краснодарского края, Кабардино-Балкарской Республики у животных была выявлена условно-патогенная микрофлора, которая могла стать фактором возникновения дыхательной патологии при снижении иммунитета, воздействии неблагоприятных факторов или нарушения в проведении терапевтических мероприятий первичного заболевания, которые могут вызывать вторичные патологии.

#### ***2.2.10.3. Выявление чувствительности у штаммов, полученных из носовой слизи телят к антибактериальным препаратам***

В сельскохозяйственном производственном кооперативе племенном репродукторе «Красный Маныч» высокая чувствительность наблюдалась к гентамицину (94,4%).

В ИП «Демченко» высокая чувствительность отмечалась к ципрофлоксацину (75,2 %), левофлоксацину (92,3 %), байтрилу (91,6 %), офлоксацину (90,6 %), цефотаксиму (92,4 %), кобактану (86,5 %), гентамицину (100,0 %).

В сельскохозяйственном производственном кооперативе «Владимировский» высокая чувствительность наблюдалась к гентамицину (80,8 %).

В КФХ Барсук Т.Л., Павловского района Краснодарского края высокая чувствительность наблюдалась к ципрофлоксацину (79,0%), левофлоксацину (84,8%), байтрилу (88,5%), офлоксацину (96,0%).

В ООО «Колхоз Псынадаха» Кабардино-Балкарской Республики высокая чувствительность наблюдалась к цефотаксиму (99,1%), кобактану (92,6%).

#### ***2.2.10.4. Определение терапевтической эффективности разработанной ниосомальной формы цефотаксима***

Проведено исследование по определению терапевтической эффективности разработанной формы ниосомального цефотаксима при заболеваниях верхних и нижних дыхательных путей телят 2,2-2,4 месячного возраста в ООО «Колхоз Псынадаха» Кабардино-Балкарской Республики. Проводилась комплексная диагностика с учетом данных анамнеза, симптомов, результатов бактериологического анализа и выявления резистентности к антибактериальным препаратам.

На протяжении исследования регистрировались такие показатели как: температура тела, количество дыхательных движений, сердечных сокращений, цвет и состояние слизистых оболочек, характер кашля, хрипов, наличие носовых истечений, поведение, аппетит, регистрировали сроки выздоровления животных и их количество.

Заболевания верхних и нижних дыхательных путей у телят протекали с характерными клиническими признаками. Отмечалось угнетение общего состояния, малоподвижность, животные чаще лежали, были безучастны к окружающей обстановке. При острой форме наблюдали увеличение температуры тела на 0,5-1 °С, отмечалась тахикардия, учащение дыхательных движений, кашель, носовые истечения серозно-слизистого и слизисто-гнойного характера. При аускультации грудной клетки было слышно жесткое везикулярное дыхание, в верхней и средней части проекции легких имелись участки вибрации звука – начальная стадия формирования хрипов.

Применение препаратов различных фармакологических групп в терапии заболеваний верхних и нижних дыхательных путей бактериальной этиологии у телят представлено в таблице 14.

Таблица 14 – Применение препаратов различных фармакологических групп в терапии заболеваний верхних и нижних дыхательных путей бактериальной этиологии у телят

Препарат	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа
Цефотаксим	15,0 мг/кг внутримышечно 2 раза в сутки 8 дней			
Флунекс	2 мл на 45 кг живой массы внутримышечно 5 дней	2 мл на 45 кг живой массы внутримышечно 5 дней	2 мл на 45 кг живой массы внутримышечно 5 дней	2 мл на 45 кг живой массы внутримыше чно 5 дней
Бутофан	10 мл внутримышечно однократно в 1-й день.	10 мл внутримышечно однократно в 1- й день.	10 мл внутримышечно однократно в 1- й день.	10 мл внутримыше чно однократно в 1-й день.
Ниосомальная форма цефотаксима		5,0 мг/кг внутримышечно 1 раз в сутки 5 дней	6,5 мг/кг кг живой массы внутримышечно 1 раз в сутки 5 дней	8,0 мг/кг внутримыше чно 1 раз в сутки 5 дней

Для более объективной оценки общего состояния телят при включении в схему лечения ниосомальной формы цефотаксима изучали гематологические и биохимические показатели крови до начала терапии, а затем на 3 и 7 день после начала эксперимента. В качестве нормы учитывали значения гематологического статуса клинически здоровых телят.

При анализе результатов гематологических показателей крови телят до начала лечения из ООО «Колхоз Псынадаха» Кабардино-Балкарской Республики, выявили, что количество эритроцитов, уровни гемоглобина и гематокрита находились в нижних границах нормы, а скорость оседания эритроцитов, содержание лейкоцитов повышены. К 3-му дню терапии в границах нормы были показатели только четвертой группы, где животным вводили ниосомальную форму цефотаксима. На 7 день лечения во всех группах показатели были в пределах нормы, однако в первой группе наблюдалась достоверная разница с фоновыми показателями.

В исследовании биохимических показателей крови телят до начала лечения, отмечалось во всех группах снижение содержания общего белка, альбумина, глюкозы, холестерина, АСТ, АЛТ, при этом повышение уровня мочевины и общего билирубина. На третий день терапии рассматриваемые показатели в четвертой группе находились в границах физиологической нормы. К концу эксперимента содержания общего белка, альбумина, глюкозы, холестерина, АСТ, АЛТ, уровень мочевины и общего билирубина были в границах нормы во всех группах.

Таким образом, наиболее эффективной оказалась схема лечения животных 4 группы, включающая применение ниосомальной формы цефотаксима в дозе – 8,0 мг/кг на протяжении 5 дней, а также флунекс 2 мл на 45 кг живой массы внутримышечно 5 дней и бутофан 10 мл внутримышечно однократно в 1-й день.

Необходимо отметить, что применение ниосомальной формы цефотаксима способствовало выздоровлению всех больных животных, при этом длительность

заболевания сократилась на 24%, также отсутствовали осложнения, которые могли быть вызваны действием антибиотикорезистентной микрофлоры. Склонны полагать, что этого не произошло в связи с: высокой эффективностью включения цефотаксима в везикулы, сохранением (стабильностью) их структуры, модифицированной скоростью высвобождения, способностью взаимодействия ниосом с компонентами крови и их циркуляции в организме, направленным действием препарата, достижением и сохранением необходимой концентрации на протяжении всего курса лечения в организме больных животных, снижения суточной дозы за счет уменьшения разовой дозы и кратности введения.

#### ***2.2.10.5. Определение терапевтической эффективности разработанной ниосомальной формы офлоксацина***

Проведено исследование по определению терапевтической эффективности разработанной ниосомальной формы офлоксацина при заболевании верхних и нижних дыхательных путей у телят 2,0-3,0 месячного возраста КФХ Барсук Т.Л. Павловского района Краснодарского края. Проводилась комплексная диагностика с учетом данных анамнеза, симптомов, результатов бактериологического анализа и выявления резистентности к антибактериальным препаратам.

На протяжении исследования регистрировались такие показатели как: температура тела, количество дыхательных движений, сердечных сокращений, цвет и состояние слизистых оболочек, характер кашля, хрипов, наличие носовых истечений, поведение, аппетит, регистрировали сроки выздоровления животных и их количество.

Применение препаратов различных фармакологических групп в терапии заболеваний верхних и нижних дыхательных путей бактериальной этиологии у телят представлено в таблице 15.

Проявились признаки патологии дыхательной системы: одышка, серозные выделения из носа и учащенное везикулярное дыхание. Первые симптомы поражения органов дыхания проявлялись в виде умеренного ускорения дыхания и пульса, а также усиленное везикулярное дыхание и жидкий прозрачный носовой секрет. Отмечалось угнетение общего состояния, малоподвижность, животные чаще лежали, были безучастны к окружающей обстановке. При острой форме наблюдали увеличение температуры тела на 0,5-1 °С.

В КФХ Барсук Т.Л. Павловского района Краснодарского края при анализе результатов гематологических показателей крови телят до начала лечения выявили, что содержание эритроцитов, уровень гемоглобина, а также гематокрита находились в нижних границах нормы, а скорость оседания эритроцитов, содержание лейкоцитов повышены.

К 3-му дню терапии в границах нормы были показатели только четвертой группы. На 5 день лечения во всех группах показатели были в пределах нормы, однако в первой группе наблюдалась достоверная разница с фоновыми показателями. При анализе биохимических показателей крови телят до начала лечения, отмечалось во всех группах снижение содержания общего белка, альбумина, глюкозы, холестерина, АСТ, АЛТ, при этом повышение уровня мочевины и общего билирубина. На третий день терапии рассматриваемые показатели в четвертой группе находились в границах физиологической нормы. К концу эксперимента содержания общего белка, альбумина, глюкозы, холестерина, АСТ, АЛТ, уровень мочевины и общего билирубина были в границах нормы во всех группах.

Таблица 15 – Применение препаратов различных фармакологических групп в терапии заболеваний верхних и нижних дыхательных путей бактериальной этиологии у телят

Препарат	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа
Офлоксацин	10,0 мг/кг внутримышечно 2 раза в сутки 10 дней			
Кетопрофен 10%	3 мл на 1 животное внутримышечно 1 раз в день 3 дня	3 мл на 1 животное внутримышечно 1 раз в день 3 дня	3 мл на 1 животное внутримышечно 1 раз в день 3 дня	3 мл на 1 животное внутримышечно 1 раз в день 3 дня
Фосфозал	6 мл на 1 животное внутримышечно 1 раз в день 5 дней	6 мл на 1 животное внутримышечно 1 раз в день 5 дней	6 мл на 1 животное внутримышечно 1 раз в день 5 дней	6 мл на 1 животное внутримышечно 1 раз в день 5 дней
Элеовит	2 мл на 1 животное внутримышечно 1 раз	2 мл на 1 животное внутримышечно 1 раз	2 мл на 1 животное внутримышечно 1 раз	2 мл на 1 животное внутримышечно 1 раз
Ниосомальная форма офлоксацина		2,0 мг/кг животного внутримышечно 1 раз в сутки. Курс – 5 дней	4,0 мг/кг внутримышечно 1 раз в сутки. Курс – 5 дней	6,0 мг/кг внутримышечно 1 раз в сутки. Курс – 5 дней

Применение ниосомальной формы офлоксацина способствовало выздоровлению всех больных животных, при этом длительность заболевания сокращалась, также отсутствовали осложнения. Мы можем это объяснить: высокой эффективностью включения офлоксацина в везикулы, сохранением (стабильностью) их структуры, модифицированной скоростью высвобождения, способностью взаимодействия ниосом с компонентами крови и их циркуляции в организме, направленным действием препарата, достижением и сохранением необходимой концентрации на протяжении всего курса лечения в организме больных животных, снижения суточной дозы за счет уменьшения разовой дозы и кратности введения.

Таким образом, наиболее эффективная схема лечения у животных 4 группы, включающая введение ниосомальной формы офлоксацина в дозе – 6,0 мг/кг на протяжении 5 дней, а также кетопрофен 3 мл на 1 животное внутримышечно 1 раз в день 3 дня, фосфозал 6 мл на 1 животное внутримышечно 1 раз в день 5 дней и элеовит 2 мл на 1 животное внутримышечно однократно.

#### ***2.2.10.6. Определение терапевтической эффективности разработанной ниосомальной формы гентамицина***

Проведено исследование по определению терапевтической эффективности, разработанной ниосомальной формы гентамицина при заболевании верхних и нижних дыхательных путей у телят 2,0-2,5 месячного возраста в сельскохозяйственном производственном кооперативе племенном репродукторе «Красный Маныч» Туркменского района.

На протяжении исследования регистрировались такие показатели как: температура тела, количество дыхательных движений, сердечных сокращений, цвет и состояние слизистых оболочек, характер кашля, хрипов, наличие носовых истечений, поведение, аппетит, регистрировали сроки выздоровления животных и их количество.

Применение препаратов различных фармакологических групп в терапии заболеваний верхних и нижних дыхательных путей бактериальной этиологии у телят представлено в таблице 16.

Таблица 16 – Применение препаратов различных фармакологических групп в терапии заболеваний верхних и нижних дыхательных путей бактериальной этиологии у телят

Препарат	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа
Гентамицин сульфат	4,0 мг/кг внутримышечно 2 раза в сутки 10 дней			
Тетравит	3 мл на 1 животное внутримышечно 1 раз	3 мл на 1 животное внутримышечно 1 раз	3 мл на 1 животное внутримышечно 1 раз	3 мл на 1 животное внутримышечно 1 раз
Глюкоза 40%	40 мл на 1 животное внутривенно 1 раз в день 3 дня	40 мл на 1 животное внутривенно 1 раз в день 3 дня	40 мл на 1 животное внутривенно 1 раз в день 3 дня	40 мл на 1 животное внутривенно 1 раз в день 3 дня
Хлорид кальция 10%	10 мл на 1 животное внутримышечно 1 раз в день 2 дня	10 мл на 1 животное внутримышечно 1 раз в день 2 дня	10 мл на 1 животное внутримышечно 1 раз в день 2 дня	10 мл на 1 животное внутримышечно 1 раз в день 2 дня
Ниосомальная форма гентамицина		1,0 мг/кг внутримышечно 1 раз в сутки 5 дней	1,5 мг/кг внутримышечно 1 раз в сутки 5 дней	2,0 мг/кг внутримышечно 1 раз в сутки 5 дней

Наблюдались следующие клинические признаки заболеваний верхних и нижних дыхательных путей у телят: усиленное везикулярное дыхание, жидкий прозрачный носовой секрет, тахикардия, тахипноэ. Животные были угнетены, малоподвижны, чаще лежали, были безучастны к окружающей обстановке. Регистрировалось незначительное повышение температуры тела.

В сельскохозяйственном производственном кооперативе племенном репродукторе «Красный Маныч» Туркменского района при анализе результатов гематологических показателей крови телят до начала лечения, выявили, что количество эритроцитов, уровень гемоглобина и гематокрита были ниже нормы, а скорость оседания эритроцитов, содержание лейкоцитов повышены. К 3-му дню терапии в первой группе содержание эритроцитов было ниже фоновых показателей на 25%, во второй группе на 20%, в третьей и четвертой группах достоверной разницы с фоновыми показателями не наблюдалось.

В исследовании биохимических показателей крови телят до начала лечения, отмечалось во всех группах снижение содержания общего белка, альбумина, глюкозы, холестерина, АСТ, АЛТ, при этом повышение уровня мочевины и общего билирубина. На третий день терапии рассматриваемые показатели в четвертой группе находились в

границах физиологической нормы. К концу эксперимента содержания общего белка, альбумина, глюкозы, холестерина, АСТ, АЛТ, уровень мочевины и общего билирубина были в границах нормы во всех группах.

Терапевтическая эффективность разработанной ниосомальной формы гентамицина выше, что подтверждается снижением длительности заболевания, выздоровлением всех животных, а также отсутствием осложнений. Таким образом, наиболее эффективная схема лечения телят с заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей у 4 группы, включающая применение ниосомальной формы гентамицина в дозе – 2 мг/кг на протяжении 5 дней, а также тетрациклина 3 мл на 1 животное внутримышечно 1 раз, глюкозы 40% 40 мл на 1 животное внутривенно 1 раз в день 2 дня и хлорида кальция 10% 10 мл на 1 животное внутримышечно однократно.

Терапевтическая эффективность разработанных ниосомальных форм антибактериальных препаратов у телят с заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей складывалась из уменьшения суточной дозы антибактериальных препаратов, пролонгирования нахождения необходимой концентрации в патологическом очаге, сокращения курса лечения больных животных, а также существенного снижения количества расходуемого действующего вещества.

#### **2.2.11. Экономическая эффективность применения ниосомальных форм антибактериальных препаратов у телят с заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей**

Установлено, что при проведении терапевтических мероприятий у телят с заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей с применением ниосомальной формы цефотаксима экономическая эффективность составила 3,71 рубля на 1 рубль затрат; с применением ниосомальной формы гентамицина экономическая эффективность – 8,35 рубля на 1 рубль затрат; с применением ниосомальной формы офлоксацина экономическая эффективность 4,78 рубля на 1 рубль затрат. Произведенные расчеты экономической эффективности применения ниосомальных форм антибактериальных препаратов свидетельствуют о том, что их использование в терапии телят с патологиями дыхательной системы бактериальной этиологии является рентабельным и целесообразным.

### **3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В результате проведенных исследований получены, апробированы ниосомальные формы антибактериальных препаратов разных групп широкого спектра действия, с индивидуально подобранным составом для каждого препарата, со значительной эффективностью включения действующих веществ в структуру везикул и высокой степенью гомогенности системы. Проведено определение скорости модифицированного высвобождения действующих веществ из ниосом *in vitro*.

В процессе изучения системы доставки исследована возможность хранения ниосомальных дисперсий с включенными антибактериальными препаратами с учетом их стабильности.

Проведена токсикологическая оценка ниосомальных форм антибактериальных препаратов, включавшая определение летальных доз, кумуляции, местно-раздражающих и аллергенных свойств.

При выполнении диссертационной работы были разработаны методики по изучению взаимодействия везикул с компонентами крови и проанализированы полученные данные, которые свидетельствуют о размещении ниосом как в плазме крови, так и лейкоцитах.

Исследованиями была установлена чувствительность культур: *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* к изучаемым антибактериальным препаратам в свободных и ниосомальных формах, также определены минимальные бактерицидные концентрации и минимальные подавляющие концентрации у препаратов. Введение антибактериальных препаратов в состав ниосомальных частиц способствовало снижению суточных доз действующих веществ, включенных в везикулы.

Применение антибактериальных препаратов в составе ниосомальных везикул в терапии инфекционных процессов у сельскохозяйственных животных повышало эффективность лечения патологий у телят, сокращало длительность курса антибиотикотерапии, повышало экономическую эффективность.

#### 4. ВЫВОДЫ

1. Разработанные, апробированные нами способы получения ниосомальных форм антибактериальных препаратов, включающие использование сорбитана моностеарата, дицетилфосфата, полиэтиленгликоля, холестерина, позволили синтезировать ниосомы в виде униламеллярных, сферических или овальных везикул. Индекс полидисперсности препаратов составил 0,19-0,21, что свидетельствовало о высокой степени гомогенности системы. Размер колебался от  $250,0 \pm 19,2$  нм до  $280,0 \pm 6,0$  нм.

2. Оптимальный состав ниосом для инкапсулирования цефотаксима, офлоксацина, гентамицина включал Span 60, холестерин, дицетилфосфат и ПЭГ в соотношении 60:34:5:1, 35:27:1:5, 50:44:5:1 соответственно, а эффективность включения действующих веществ в ниосомы составила  $63,7 \pm 1,2\%$ ;  $76,1 \pm 1,7\%$ ;  $67,8 \pm 1,4\%$  соответственно.

3. Интенсивное высвобождение антибактериальных препаратов из ниосомальных везикул *in vitro* регистрировалось в первые 4–5 часов диализа, а через 24 часа наблюдалось снижение высвобождения препаратов до 10–15%.

4. Полученные ниосомальные формы подтверждали свою стабильность во время хранения при температуре  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  в течение 6 месяцев, при сохранении до 78–86% инкапсулированного в везикулах антибактериального препарата относительно исходного значения.

5. Определено, что полученные нами ниосомальные формы антибактериальных препаратов согласно ГОСТ 12.1.007-76 по среднесмертельной пероральной дозе белым мышам и крысам относятся к 4 классу опасности: вещества малоопасные.

6. Ниосомальные формы цефотаксима, офлоксацина, гентамицина относятся по степени кумуляции к 4 группе, к веществам со слабо выраженной кумуляцией, также они не вызывают местно-раздражающего и алергизирующего действий, что позволяет отнести к классу веществ, не проявляющих раздражающего действия.

7. Установлено взаимодействие ниосомальных везикул с компонентами крови, при проведении световой микроскопии мазков смешанной культуры лейкоцитов внутри нейтрофильных гранулоцитов выявляли окрашенные ниосомы округлой формы, при сканирующей электронной микроскопии плазмы крови установлено наличие субпопуляций ниосомальных везикул, достигающих диаметра 500 – 900 нм, в одном поле зрения плазмы крови насчитывалось от 25 до 30 субпопуляций ниосом округлой формы размером около 800 нм.

8. Данные фармакокинетические параметры ниосомальных форм антибактериальных препаратов свидетельствуют об изменениях в их биораспределении, включающем: увеличение времени достижения терапевтической концентрации в плазме крови, снижение максимальной концентрации, увеличение времени полувыведения действующих веществ из организма.

9. При определении чувствительности штамма 201108 *Staphylococcus aureus*: к ниосомальной форме офлоксацина диаметр зоны задержки роста колебался в пределах  $29,9 \pm 1,31$  мм, к ниосомальной форме цефотаксима в пределах  $31,4 \pm 1,88$  мм, к ниосомальной форме гентамицина  $26,8 \pm 1,34$  мм. При определении чувствительности штамма 190158 *Pseudomonas aeruginosa*: к ниосомальной форме офлоксацина диаметр зоны задержки роста колебался в пределах  $28,0 \pm 1,68$  мм, к ниосомальной форме цефотаксима  $29,3 \pm 1,76$  мм, к ниосомальной формой гентамицина в пределах  $25,8 \pm 1,43$  мм.

10. Для *Staphylococcus aureus* штамм 201108 уровень минимальной подавляющей концентрации у ниосомальной формы цефотаксима составил  $2,3 \pm 0,12$  мкг/мл, ниосомальной формы офлоксацина –  $0,5 \pm 0,1$  мкг/мл, ниосомальной формы гентамицина  $1,1 \pm 0,06$  мкг/мл; уровень минимальной бактерицидной концентрации у ниосомальной формы цефотаксима составил  $3,3 \pm 0,2$  мкг/мл, ниосомальной формы офлоксацина –  $1,3 \pm 0,07$  мкг/мл, ниосомальной формы гентамицина  $2,6 \pm 0,13$  мкг/мл. Для *Pseudomonas aeruginosa* штамм 190158 уровень МПК у ниосомальной формы цефотаксима составил  $3,0 \pm 0,15$  мкг/мл, ниосомальной формы офлоксацина –  $1,8 \pm 0,11$  мкг/мл, ниосомальной формы гентамицина  $2,0 \pm 0,1$  мкг/мл, уровень МБК у ниосомальной формы цефотаксима составил  $3,5 \pm 0,15$  мкг/мл, ниосомальной формы офлоксацина –  $2,2 \pm 0,13$  мкг/мл, ниосомальной формы гентамицина  $3,0 \pm 0,2$  мкг/мл.

11. Способность к направленному транспорту везикул приводило к снижению суточной дозы, рассчитанной по действующему веществу, инкапсулированному в ниосомы и не снижало качества применяемой фармакотерапии.

12. Оптимальными терапевтическими дозами в результате проведенных исследований следует считать: у ниосомальной формы цефотаксима 7,5 мг/кг массы; у ниосомальной формы офлоксацина 5,0 мг/кг массы тела; у ниосомальной формы гентамицина 2,0 мг/кг массы тела, так как они создают терапевтические концентрации действующих веществ в патологическом очаге организма.

13. Внутримышечное введение в ниосомальной форме лабораторным животным в дозах: 5,0 мг/кг офлоксацина; 8,0 мг/кг цефотаксима; 2,0 мг/кг гентамицина при индуцированных внутрибрюшинных инфекционных процессах с различными этиологическими агентами способствовало сокращению длительности заболевания, а соответственно курса лечения, предотвращению появления осложнений.

14. Терапевтическая эффективность разработанных ниосомальных форм антибактериальных препаратов у телят с заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей, складывалась из уменьшения суточной дозы антибактериальных препаратов (цефотаксима – 8,0 мг/кг; офлоксацина – 6,0 мг/кг; гентамицина – 2,0 мг/кг), пролонгирования нахождения необходимой концентрации в патологическом очаге, снижения его пиковой концентрации в крови, соответственно сокращения курса лечения больных животных и токсического действия на организм, а также существенного снижения количества расходуемого действующего вещества.

15. Экономический эффект при проведении терапевтических мероприятий у телят с заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей, с применением ниосомальной формы цефотаксима составил 17074,15 руб., экономическая эффективность 3,71 рубля на 1 рубль затрат; с применением ниосомальной формы гентамицина экономический эффект составил 21740,85 рублей, экономическая эффективность – 8,35 рубля на 1 рубль затрат; с применением ниосомальной формы офлоксацина экономический эффект составил 27354,45 руб., экономическая эффективность 4,78 рубля на 1 рубль затрат.



## **ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

1. Предлагается использование ниосомальной формы цефотаксима в дозе 8,0 мг/кг, ниосомальной формы офлоксацина в дозе 6,0 мг/кг; ниосомальной формы гентамицина 2,0 мг/кг внутримышечно 1 раз в день в течение 5 дней у телят при заболеваниях инфекционной этиологии, при условии чувствительности к данным антибактериальным препаратам.

2. С целью повышения эффективности терапии инфекционных заболеваний рекомендуем использовать: способ определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам при лечении гнойно-воспалительных заболеваний животных (патент РФ № 2804102 от 15.11.2022), способ получения ниосомальной формы цефотаксима, способ получения ниосомальной формы гентамицина (Патент РФ № 2687496 от 08.10.18, Патент РФ № 2805933 от 09.02.2023), способ лечения интраперитонеального стафилококкового инфекционного процесса ниосомальным офлоксацином (Патент РФ № 2749374 от 29.10.2020).

3. Для расширения спектра характеристик ниосом рекомендуем применять: способ фракционирования ниосом (патент РФ № 2754849 от 20.07.2020), способ определения скорости высвобождения инкапсулированного в ниосомы цефотаксима *in vitro* (патент РФ № 2754850 от 20.07.2020).

4. Для определения концентрации антибактериальных препаратов методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии рекомендуем использовать способы определения цефотаксима и аминогликозидных антибиотиков (патент РФ № 2687493 от 08.10.18, патент РФ № 2786839 от 15.11.2022).

5. С целью моделирования инфекционных процессов у лабораторных животных рекомендуем применять способы интраперитонеального стафилококкового (патент РФ № 2723745 от 21.11.2019) и внутрибрюшинного синегнойного (патент РФ № 2725136 от 21.11.2019) заражения.

6. Результаты, полученные в ходе написания диссертации могут быть использованы в проведении научных исследований, в учебном процессе при подготовке специалистов, бакалавров и магистров ветеринарного и биологического направления, при составлении рекомендаций для практикующих специалистов в области ветеринарной медицины и животноводства.

## **5. ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Ниосомы представляют собой перспективную молекулу для доставки лекарственного средства. Существует множество возможностей для инкапсуляции токсичных противораковых, химиотерапевтических, противовоспалительных и противовирусных препаратов. Ниосомы возможно использовать в качестве перспективных носителей для достижения лучшей биодоступности и целенаправленных свойств, а также снижения токсичности и побочных эффектов лекарственных средств.

Перспективными направлениями разработки данной темы является:

- подбор оптимальных режимов лиофилизации препаратов ниосом;
- оценка эффективности функционализации поверхности ниосом специфичными векторными фрагментами;
- разработка режимов получения лиофилизированных ниосомальных форм антибактериальных препаратов, меченных молекулами-векторами;
- подбор специфичных векторных фрагментов для адресной доставки ниосомальных препаратов и оценка их тропности к тканям;
- оценка тропности модифицированных ниосомальных микровезикул к тканям в опытах на культурах клеток и биопробных животных;

- оценка биологических эффектов при использовании препаратов модифицированных ниосомальных везикул в опытах на биопробных животных;
- модифицирование методики получения ниосомальных препаратов в зависимости от физико-химических параметров исходных лекарственных субстанций.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ

1. Коррекция фармакокинетики гентамицина во внутриглазной жидкости / **В. Н. Шахова**, В. А. Беляев, Е. В. Сафоновская, В. В. Михайленко // Вестник ветеринарии. Материалы Международной научно–практической интернет-конференции, посвященной 65–летию кафедры паразитологии «Современные тенденции в ветеринарной медицине». – 2012. – № 63 (4). – С. 160–163.
2. Изменения биохимических показателей крови при экспериментальной офтальмопатологии / **В. Н. Шахова**, В. А. Беляев, Е. В. Сафоновская, В. В. Михайленко // Вестник ветеринарии. Материалы Международной научно-практической интернет-конференции, «Научный поиск – животноводству России». – 2013. – № 66 (3). – С. 66–68.
3. Микробиологический анализ возбудителей инфекционных заболеваний предстательной железы в Ставропольском крае у кобелей / **В. Н. Шахова**, А. А. Дорохина, В. А. Беляев, Е. В. Сафоновская, Л. Ф. Сыч // Вестник АПК Ставрополя. – 2014. – № 3 (15). – С. 91–95.
4. Фармакокинетика ципрофлоксацина при индуцированной патологии глаз / **В. Н. Шахова**, В. А. Беляев, В. А. Оробец и др. // Вестник АПК Ставрополя. – 2015. – № 4. – С. 124–129.
5. **Шахова, В. Н.** Селективные изменения поступления лекарственных веществ в ткани глаза через гематоофтальмический барьер / В. Н. Шахова // Вестник АПК Ставрополя. – 2018. – № 3. – С. 27–29.
6. Стандартизация методики определения размеров частиц в ниосомальных препаратах / Д. А. Ковалев, А. М. Жиров, **В. Н. Шахова** и др. // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2019. – № 1. – С. 146–148.
7. Фармакокинетика ципрофлоксацина в биологических жидкостях у собак с хроническим простатитом / В. А. Беляев, **В. Н. Шахова**, И. В. Беляев // Вестник АПК Ставрополя. – 2020. – № 4 (40). – С. 16–19.
8. Изучение стабильности физико-химических свойств ниосомальных препаратов в процессе хранения / **В. Н. Шахова**, А. М. Жиров, Д. А. Ковалев, Е. С. Кастарнова // Ветеринарная патология. – 2021. – № 2 (76). – С. 48–53.
9. Устройства и системы доставки антибактериальных препаратов в терапии дыхательных путей / В. А. Беляев, **В. Н. Шахова**, О. Э. Французов и др. // Вестник АПК Ставрополя. – 2022. – № 1 (45). – С. 9–13.
10. Чувствительность к антибактериальным препаратам патогенных стафилококков и стрептококков, выделенных от больных собак / Е. В. Светлакова, **В. Н. Шахова**, В. А. Беляев, Н. А. Ожередова // Вестник АПК Ставрополя. 2022. № 4 (48). С. 9–15.
11. Выявление чувствительности к антибактериальным препаратам у патогенных стафилококков и стрептококков / Е. В. Светлакова, **В. Н. Шахова**, В. А. Беляев и др. // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2023. – № 7. – С. 139–143.

12. Применение нанотехнологий для разработки новых лекарственных форм антибактериальных средств в борьбе с устойчивостью к полирезистентным штаммам микроорганизмов / **В. Н. Шахова**, В. А. Беляев, Е. В. Светлакова и др. // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2023. – № 7. – С. 129–134.

13. Говорова, М. В. Аномальная токсичность лекарственных препаратов / М. В. Говорова, **В. Н. Шахова** // Аграрный вестник Северного Кавказа. – 2024. – № 2. – С. 4–7.

#### *Патенты*

14. Патент № 2687493 Российская Федерация, МПК G01N 30/02, G01N 30/10, G01N 30/26, G01N 30/50, G01N 30/74, C07D 501/06, C07D 501/24, C07D 417/12. Способ определения цефотаксима методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии : № 2018135531: заявл. 08.10.2018 ; опубл. 14.05.2019 / А. М. Жиров, Д. А. Ковалев, Д. В. Ульшина, С. В. Писаренко, О. В. Бобрышева, А. Н. Куличенко, **В. Н. Шахова**, В. А. Беляев, Е. С. Кастарнова, И. В. Кузнецова, Ю. В. Сирица ; заявитель и патентообладатель ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – Бюл. № 14.

15. Патент №2687496 Российская Федерация, МПК А61К 31/429, А61К 47/34. Способ получения ниосомальной формы цефотаксима : № 2018135530: заявл. 08.10.2018; опубл. 14.05.2019 / Д. А. Ковалев, А.М. Жиров, Д. В. Ульшина, С. В. Писаренко, О. В. Бобрышева, А. Н. Куличенко, **В. Н. Шахова**, В. А. Беляев, Е. С. Кастарнова, А.А. Каниболоцкая, И. В. Кузнецова, Ю. В. Сирица; заявитель и патентообладатель ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – Бюл. № 14.

16. Патент № 2723745 Российская Федерация, МПК G09B 23/28. Способ моделирования интраперитонеального стафилококкового инфекционного процесса : № 2019137653 : заявл. 21.11.2019 ; опубл. 17.06.2020 / **В. Н. Шахова**, В. А. Беляев, Е. В. Светлакова, Е. С. Кастарнова, Д. А. Зинченко ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет». – Бюл. № 17.

17. Патент № 2725136 Российская Федерация, МПК G09B 23/28, C12Q 1/02. Способ моделирования внутрибрюшинного синегнойного инфекционного процесса : № 2019137642: заявл. 21.11.2019; опубл. 30.06.2020 / **В. Н. Шахова**, В. А. Беляев, Е. В. Светлакова, Е. С. Кастарнова, Д. А. Зинченко ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет». – Бюл. № 19.

18. Патент № 2749374 Российская Федерация, МПКА61К 31/538, А61Р 31/04, А61К 9/08. Способ лечения интраперитонеального стафилококкового инфекционного процесса ниосомальным офлоксацином : № 2020135763 : заявл. 29.10.2020 ; опубл. 09.06.2021 / **В. Н. Шахова**, В. А. Беляев, Е. С. Кастарнова, Д. А. Зинченко, Е. В. Светлакова, Д. А. Ковалев, А. М. Жиров ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет». – Бюл. № 16.

19. Патент № 2754849 Российская Федерация, МПК C07C 233/00, В82В 3/00, В82У 40/00. Способ фракционирования ниосом : № 2020125052 : заявл. 20.07.2020 ; опубл. 08.09.2021 / Д. А. Ковалев, А. М. Жиров, С. В. Писаренко, А. Н. Куличенко, **В. Н. Шахова**, В. А. Беляев, Е. С. Кастарнова ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет». – Бюл. № 25.

20. Патент № 2754850 Российская Федерация, МПК А61К 31/429, А61К 47/34, А61К 9/127. Способ определения скорости высвобождения инкапсулированного в ниосомы цефотаксима in vitro : № 2020125053 : заявл. 20.07.2020 ; опубл. 08.09.2021 /

Д. А. Ковалев, А. М. Жиров, С. В. Писаренко, А. Н. Куличенко, **В. Н. Шахова**, В. А. Беляев, Е. С. Кастарнова; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет». – Бюл. № 25.

21. Патент № 2786839 Российская Федерация, МПК G01N30/74, G01N30/50, G01N30/26, G01N30/10, G01N30/02. Способ определения аминогликозидных антибиотиков методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии : № 2022129592 : заявл. 15.11.2022 ; опубл. 26.12.2022 / **В. Н. Шахова**, В. А. Беляев, Е. В. Светлакова, О. И. Севостьянова, А. М. Жиров, Д. А. Ковалев ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет». – Бюл. № 36.

22. Патент № 2804102 Российская Федерация, МПК C12Q 1/18, G01N 33/48. Способ определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам при лечении гнойно-воспалительных заболеваний животных : № 2022129594 : заявл. 15.11.2022 ; опубл. 26.09.2023 / **В. Н. Шахова**, Е. В. Светлакова, В. А. Беляев, О. И. Севостьянова, А. А. Усольцева, М. В. Говорова ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет». – Бюл. № 27.

23. Патент № 2805933 Российская Федерация, МПК A61K9/133, A61K 31/7036, A61K 47/14, A61K 47/24, A61K 47/26, A61K 47/28. Способ получения ниосомальной формы гентамицина : № 2023102855 : заявл. 09/02/2023 ; опубл. 24/10/2023 / **В. Н. Шахова**, В. А. Беляев, О. И. Севостьянова, Е. В. Светлакова, А. М. Жиров, Д. А. Ковалев ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет». – Бюл. № 30.

*Публикации, индексируемые в Web of Science и Scopus*

24. Niosomes: a promising drug delivery system / **V. Shakhova**, V. Belyaev, E. Kastarnova et al. // E3S Web of Conferences INTERAGROMASH. – 2020. – 175. – P. 1–6.

25. Modelling an experimental systemic pseudomonas infection process / **V. Shakhova**, E. Svetlakova, V. Belyev et al. // E3S Web of Conferences. – 2023. – 420. – P. 1–7.

26. Drug delivery systems meeting quality and safety requirements / **V. N. Shakhova**, V. A. Belayev, V. A. Orobec et al. // Innovations in Sustainable Agricultural Systems. – 2024. – Volume 2. – P. 193–200.

*Публикации в материалах конференций и других научно-практических изданиях*

27. Моделирование внутриглазного инфекционного процесса / **В. Н. Шахова**, В. А. Беляев, Е. В. Сафоновская и др. // Региональная научно-практическая конференция «Инновационные разработки молодых ученых юга России». – 2012. – С. 177–180.

28. Проницаемость гематофтальмического барьера в норме и при патологии препаратами группы аминогликозидов / **В. Н. Шахова**, В. А. Беляев, Е. В. Сафоновская, А. А. Дорохина // Региональная научно-практическая конференция «Инновационные разработки молодых ученых юга России». – 2012. – С. 180–182.

29. Гематологический анализ крови кроликов при стафилококковой офтальмоинфекции / **В. Н. Шахова** // Материалы IV Международной конференции «Инновационные разработки молодых ученых – развитию агропромышленного комплекса»: Сборник научных трудов ФГБНУ ВНИИОК, Ставрополь, 2015 г. – Том 1. – Вып. 8. – Ставрополь : Бюро новостей, 2015. – С. 552–554.

30. Обоснование применения микро- и нанокапсулированных форм лекарственных препаратов в ветеринарии / В. А. Беляев, Д. А. Ковалев, С. В. Писаренко и др. // V Международная конференция «Инновационные разработки молодых

ученых – развитию агропромышленного комплекса». Сборник научных трудов. ФГБНУ ВНИИОК. – Ставрополь, 2016. – Т. 1. – Вып. 8. – С. 265–268.

31. The use of micro- and nanocapsulation drugs in the treatment of systemic diseases in animals / **V. N. Shakhova**, V. A. Belyaev, E. S. Kastarnova // World science: problems and innovations. – 2018. – P. 30–32.

32. Ниосомы как средство направленного транспорта антибактериальных препаратов / **В. Н. Шахова**, В. А. Беляев, Е. С. Кастарнова, А. А. Каниболоцкая // Актуальные вопросы патологии, морфологии и терапии животных материалы 19-й Международной научно-методической конференции по патологической анатомии животных. – 2018. – С. 161–164.

33. Исследование антибактериальной активности цефотаксима в составе наночастиц хитозана в эксперименте / А. М. Жиров, Д. А. Ковалев, Ю. В. Сирица **В. Н. Шахова** и др. // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных. Материалы III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием под ред. А. Н. Куличенко. – 2019. – С. 264–265.

34. Проницаемость гематоэнцефалического барьера для антибактериальных препаратов / Е. В. Пашкова, **В. Н. Шахова** // Материалы V Международного конгресса ветеринарных фармакологов и токсикологов «Эффективные и безопасные лекарственные средства в ветеринарии». – СПб., 2019. – С. 149–151.

35. **Шахова, В. Н.** Структурные особенности ниосомальных везикул / **В. Н. Шахова** // Сельскохозяйственный журнал. – 2020. – №5 (13). – С. 88–93.

36. **Шахова, В. Н.** Современные методы определения антибактериальных препаратов в продукции животноводства / **В. Н. Шахова** // Зоотехническая наука в условиях современных вызовов : сборник трудов II научно-практической конференции с международным участием. – 2020. – С. 119–122.

37. Определение чувствительности *Staphylococcus aureus* к аптечной и ниосомальной формам офлоксацина / Е. В. Светлакова, **В. Н. Шахова**, Д. А. Ковалев, А. М. Жиров // Фундаментальные и прикладные научные исследования: актуальные вопросы, достижения и инновации : Сборник статей XXXVI Международной научно-практической конференции, 27 июля 2020 г. в г. Пенза. – С. 48–50.

38. Инновационные технологии в фармации: липосомальные формы лекарственных препаратов / **В. Н. Шахова**, К. Гулян // Инновационные технологии в сельском хозяйстве, ветеринарии и пищевой промышленности. ФГБОУ ВО СтГАУ. – 2022. – С. 249–252.

39. **Шахова, В. Н.** Стратегии включения лекарств в носители на основе наночастиц / В. Н. Шахова // Перспективные разработки молодых ученых в области ветеринарии, производства и переработки сельскохозяйственной продукции : сборник статей / Ставропольский гос. аграрный ун-т. – Ставрополь, 2023. – С. 239–243.

40. Изучение проницаемости барьерных структур предстательной железы антибактериальными препаратами группы аминогликозидов у мышей в норме / **В. Н. Шахова**, А. А. Дорохина, А. В. Дегтяренко и др. // Инновации в АПК: проблемы и перспективы. – 2014. – С. 96–101.

*Учебно-методическое пособие*

41. Применение антибактериальных препаратов в составе ниосомальных везикул в терапии заболеваний животных / **В. Н. Шахова**, В. А. Беляев // АГРУС. – Ставрополь, 2024. – 68 с.

Подписано в печать 26.12.2024. Формат 60x84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Гарнитура «Таймс».  
Бумага офсетная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 2,0. Тираж 130. Заказ № 624.  
Отпечатано в типографии издательско-полиграфического комплекса СтГАУ  
«АГРУС», г. Ставрополь, ул. Пушкина, 15.