

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Попова Екатерина Васильевна

**ГИБРИДНЫЕ ЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ФОСФАТА КАЛЬЦИЯ И
ХИТОЗАНА КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НОСИТЕЛИ
ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ**

1.5.6. – Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2023

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Научные руководители

– **Кост Ольга Алексеевна**
кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник

Тихомирова Виктория Евгеньевна
кандидат химических наук, научный сотрудник

Официальные оппоненты

– **Кильдеева Наталия Рустемовна**, доктор химических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство)», Институт химических технологий и промышленной экологии, кафедра химии и технологии полимерных материалов и нанокompозитов, заведующая кафедрой

Орлова Марина Алексеевна, доктор химический наук, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, кафедра радиохимии, ведущий научный сотрудник

Трушина Дарья Борисовна, кандидат физико-математических наук, Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук, старший научный сотрудник

Защита диссертации состоится 30 мая 2023 г. в 15:00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.014.4 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 11, ауд. 202.

E-mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/014.4/2515>

Автореферат разослан «24» апреля 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



И.К. Сакодынская

Общая характеристика работы

Актуальность темы. По данным Всемирной организации здравоохранения, около 300 миллионов человек во всем мире живут с серьезными нарушениями зрения. К заболеваниям переднего отрезка глаза относятся аномалии рефракции, катаракта, глаукома, увеит; к заболеваниям заднего отрезка – заболевания сетчатки, такие как возрастная макулярная дегенерация сетчатки, диабетическая ретинопатия. Вышеперечисленные заболевания являются основными причинами частичной и полной слепоты. При медикаментозной терапии глазных заболеваний предпочтительно местное введение препаратов с помощью глазных капель, поскольку оно может осуществляться самим пациентом. Глазные капли составляют около 90% продаваемых офтальмологических препаратов. Однако во внутренние ткани глаза попадает не более 5% от общей вводимой таким образом дозы из-за наличия барьера роговицы и смыва слезной жидкостью. Для увеличения эффективности проникновения препаратов и преодоления проблем, связанных с неинвазивными и инвазивными способами лечения, можно использовать системы доставки лекарственных средств на основе частиц различной природы. Наиболее привлекательными являются наноразмерные носители, так как они могут улучшить проникновение лекарственных средств во внутренние области глаза, увеличить эффективность и длительность действия препарата, а также обеспечить его контролируемое высвобождение. Среди различных носителей большой интерес представляют неорганические кальций-фосфатные частицы (СаР-частицы) благодаря их биосовместимости, биodeградируемости, контролируемому получению. Материалы на основе фосфата кальция широко используются в тканевой инженерии и для доставки лекарств. Возможно включение в носители на основе фосфата кальция как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных веществ.

Для усиления взаимодействия между наночастицами и отрицательно заряженной поверхностью роговицы и, соответственно, увеличения времени пребывания частиц на поверхности глаза можно использовать покрытие положительно заряженными биоадгезивными полимерами. Хитозан является наиболее широко используемым катионным полимером из-за его уникальных свойств, таких как биосовместимость, биоразлагаемость и способность усиливать транспорт лекарств через барьер роговицы. Эти свойства делают хитозан перспективным материалом для покрытия СаР-наночастиц, которые можно было бы использовать для доставки лекарственных средств в глаз.

Патогенез множества заболеваний глаза связан с ишемией, воспалением, повышенным внутриглазным давлением (ВГД) и окислительным стрессом. Одной из систем организма, регулирующей эти процессы, является ренин-ангиотензин-альдостероновая система, основным ферментом которой является ангиотензин-превращающий фермент (АПФ). АПФ принимает участие в развитии заболеваний, связанных с изменением ВГД, воспалением и ишемией тканей глаза. Имеются сведения о терапевтическом действии ингибиторов АПФ при дистрофии

сетчатки глаза, диабетической ретинопатии, ожоговой болезни глаз и глаукоме за счет снижения концентрации ангиотензина II – продукта реакции гидролиза ангиотензина I посредством АПФ.

С другой стороны, снижения окислительного стресса, сопровождающего многие заболевания глаз, можно добиться путем использования антиоксидантных ферментов, например, супероксиддисмутазы 1. Супероксиддисмутаза 1 (СОД1) – фермент, катализирующий реакцию дисмутации супероксид-радикала и, таким образом, снижающий концентрацию активных форм кислорода в клетке, в частности, предотвращая их взаимодействие с оксидом азота и не позволяя концентрации оксида азота падать. Снижение уровня оксида азота ухудшает отток внутриглазной жидкости и увеличивает внутриглазную гипертензию. Показана эффективность местного применения СОД1 для лечения окислительного стресса и воспалительных процессов в глазу.

Таким образом, разработка новых носителей на основе фосфата кальция и хитозана, содержащих ингибитор АПФ эналаприлат и фермент СОД1, для применения в офтальмологии является актуальной.

Степень разработанности темы исследования. В литературе имеются примеры разработки носителей для доставки лекарственных средств в офтальмологии, в частности, с использованием как фосфата кальция, так и хитозана. К моменту начала работы были получены СаР-частицы, покрытые целлюбиозой, с включенными ингибитором АПФ лизиноприлом, β -блокатором тимололом и СОД1 и показано, что включение препаратов в СаР-частицы усиливало терапевтический эффект: более эффективно снижалось ВГД под действием лизиноприла и тимолола, а также более эффективно снижались клинические проявления воспалительного заболевания глаз – увеита под действием СОД1. Также показана возможность покрытия СаР-частиц хитозаном (89 кДа, степень деацетилирования 87%).

Цели и задачи работы. Получение и характеристика носителей офтальмологических препаратов различной природы (низкомолекулярного ингибитора АПФ и фермента) на основе фосфата кальция и различных видов хитозана.

Исходя из поставленной цели, были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Оптимизировать условия получения СаР-частиц при разных температурах для получения стабильных суспензий частиц с узким распределением по гидродинамическому диаметру и подобрать условия для покрытия частиц хитозаном двух видов;
- 2) Выбрать наиболее эффективный метод включения низкомолекулярного ингибитора АПФ и фермента СОД1 в частицы на основе фосфата кальция и хитозана;
- 3) Разработать условия получения хитозановых частиц, содержащих ингибитор АПФ, для сравнения их характеристик с аналогичными гибридными частицами;
- 4) Провести комплексное исследование полученных частиц с включенными препаратами *in*

vitro, а также *in vivo* по их влиянию на величины ВГД у нормотензивных кроликов.

Научная новизна. В настоящей работе предложены разные условия получения СаР-наночастиц, позволяющие включать как низкомолекулярные субстанции, так и ферменты, определен их фазовый состав, морфология, размер и поверхностный заряд. Разработанная методика позволяет получать частицы с узким распределением по гидродинамическому диаметру, контролируемые формой и размером. Разработаны условия покрытия СаР-частиц двумя разными видами хитозана – 5 кДа хитозаном и 72 кДа гликоль-хитозаном. Подобраны условия включения эналаприлата и СОД1 в СаР- и гибридные частицы. Впервые получены гибридные частицы, содержащие ингибитор АПФ эналаприлат, СОД1, а также совместно эналаприлат и СОД1. Предложены условия получения хитозановых частиц на основе 5 кДа и гликоль-хитозана, содержащих ингибитор АПФ эналаприлат. Продемонстрировано, что высвобождение препаратов из гибридных частиц происходит значительно медленнее, чем из СаР-частиц.

Впервые показано увеличение времени удерживания препаратов в слезной жидкости кроликов при их инстилляции в составе гибридных и хитозановых частиц. Продемонстрировано более сильное падение ВГД при введении эналаприлата и СОД1 в составе гибридных частиц по сравнению с водным раствором препаратов. Показано, что совместное включение эналаприлата и СОД1 приводило к синергическому гипотензивному действию. Продемонстрирована большая эффективность при использовании гибридных частиц как по сравнению с непокрытыми СаР-частицами, так и с хитозановыми.

Теоретическая и практическая значимость работы. В работе создана база для получения СаР-частиц, хитозановых и гибридных частиц на основе фосфата кальция и хитозана для биомедицинского применения. Разработанные методы синтеза позволяют получить частицы с заданными характеристиками, которые определяют их эффективность в качестве носителя для доставки терапевтических средств в глаз, а также включить низко- и высокомолекулярные вещества и обеспечить их медленное высвобождение. Разработанные в диссертации подходы могут быть использованы в качестве практических рекомендаций для получения носителей на основе гибридных и хитозановых частиц для доставки лекарственных средств в ткани глаза и имеют важное прикладное значение.

В диссертационной работе показана возможность совместного включения в гибридные частицы препаратов, имеющих разный механизм влияния на внутриглазное давление, что обеспечивает синергическое гипотензивное действие.

Результаты, полученные в ходе работы над совместно включенными препаратами в гибридные частицы, легли в основу заявки на патент на изобретение № 2022133568/20(073114) от 20.12.2022.

Положения, выносимые на защиту.

- 1) Варьируя температуру и pH среды синтеза, а также концентрацию стабилизирующего агента, можно формировать стабильные CaP-частицы с узким распределением по гидродинамическому диаметру и различной морфологией;
- 2) Покрытие CaP-частиц хитозанами двух видов позволяет получить стабильные гибридные частицы, состоящие из неорганического ядра и хитозанового покрытия и характеризующиеся положительным ζ -потенциалом;
- 3) Гибридные частицы на основе фосфата кальция и хитозана могут служить перспективными носителями как низкомолекулярных соединений, например, ингибитора АПФ эналаприлата, так и высокомолекулярных, таких как фермент СОД1, обеспечивающими медленное высвобождение препаратов в раствор и увеличение времени их удерживания в слезной жидкости;
- 4) Использование гибридных частиц в качестве носителей лекарственных препаратов позволяет более эффективно и пролонгировано снижать ВГД при местном капельном применении.

Методология и методы исследования.

Выбор препаратов для инкапсулирования был обусловлен их востребованностью в качестве лекарственных средств, а также действием *in vivo*. Для получения CaP-частиц использовали метод соосаждения с одновременной ультразвуковой обработкой суспензии. Для характеристики частиц были задействованы современные методы анализа: растровая электронная микроскопия (РЭМ), проникающая электронная микроскопия (ПЭМ); рентгенофазовый анализ (РФА), адсорбция-десорбция азота по Брунауэру-Эммету-Теллеру (БЭТ), динамическое светорассеяние (ДСР). Для определения содержания включаемых препаратов и хитозана использовали спектрофотометрические (для оценки содержания хитозана и активности СОД1), флюорометрические (определение активности АПФ) методы, а также ИК-Фурье спектроскопию. Для оценки действия включенных препаратов на значения ВГД использовали здоровых кроликов шиншилла мужского пола.

Личный вклад автора. Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование, выполнение экспериментов, сбор и обработку данных, оформление и публикацию результатов. Эксперименты *in vivo* проводились совместно с Институтом глазных болезней им. Гельмгольца.

Степень достоверности и апробация результатов.

Достоверность представленных в диссертации данных и сделанных выводов определяется использованием большого количества современных методов исследования и выполнением экспериментов на высокоточном оборудовании с обработкой результатов статистическими

методами, принятыми в научной практике. Все эксперименты проводили в трех и более независимых повторах.

Основные результаты работы были представлены на Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2019», «Ломоносов-2020», и «Ломоносов-2021» (Москва, 2019, 2020, 2021); 12th International Conference «Biocatalysis: Fundamentals and Applications» (Санкт-Петербург, 2019); Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Фундаментальные науки – специалисту нового века» с международным участием (Иваново, 2020); Applied Nanotechnology and Nanoscience International Conference – ANNIC 2021 (Франция, 2021); International Symposium on SupraBiomolecular Systems 2021 (Франция, 2021); 12th International Congress «Biomaterials and Nano-biomaterials: Recent Advances Safety - Toxicology and Ecology Issues» (Греция, 2021); научно-практической конференции с международным участием «XV Российский общенациональный офтальмологический форум» (Москва, 2022)

Публикации. По результатам диссертационной работы опубликовано 5 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых базами Web of Science и Scopus, и 5 тезисов докладов всероссийских и международных конференций.

Связь работы с государственными программами. Работа выполнена при поддержке МГУ имени М.В. Ломоносова (тема госрегистрации 121041500039-8). Часть результатов получена в рамках гранта «Умник-2021» Фонда содействия инновациям (договор №16362ГУ/2021)

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (глава 1), экспериментальной части (глава 2), описывающей материалы и методы исследования, результатов и их обсуждения (глава 3), заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 168 страницах, содержит 40 таблиц и 38 рисунков. Список литературы включает 247 ссылок.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Влияние условий получения на характеристики CaP-частиц

В рамках данного раздела проведено исследование влияния условий синтеза CaP-частиц на их характеристики. Методика получения CaP-частиц заключалась в смешивании эквимольных растворов гидрофосфата калия, хлорида кальция и стабилизирующего агента цитрата натрия одновременно с ультразвуковым воздействием. Изучали влияние pH исходного раствора гидрофосфата калия, температуры, концентрации цитрата натрия, мощности и времени ультразвукового воздействия на характеристики получаемых частиц.

В условиях, указанных в подписи к табл. 1, уменьшение pH исходного раствора гидрофосфата калия в отсутствие охлаждения приводило к увеличению гидродинамического диаметра частиц, а при низкой температуре синтеза суспензия была нестабильной.

Табл. 1. Зависимость среднего гидродинамического диаметра пустых СаР-частиц от значения рН исходного раствора гидрофосфата калия и температуры синтеза (концентрация цитрата натрия 15,6 мМ, время ультразвуковой обработки 20 минут, мощность 200 Вт).

Условия	t _{нач} , °С	t _{кон} , °С	d, нм/PDI					
			рН 8,8		рН 7,5		рН 7,0	
Без охлаждения	23	60-70	80±20	0,16	230±20	0,49	350±35	0,51
Лед+вода	4	20-23	>1000	-	>1000	0,72	>1000	0,63

Для получения стабильных частиц при низкой температуре синтез СаР-частиц осуществляли в присутствии более высоких концентраций цитрата натрия (Табл. 2). При этом частицы с небольшим гидродинамическим диаметром получались при рН 7,0.

Табл. 2. Влияние концентрации цитрата натрия на характеристики СаР-частиц при низкой температуре синтеза.

С(цитрат), мМ	рН 7,5			рН 7,0		
	d, нм	PDI	ζ, мВ	d, нм	PDI	ζ, мВ
15,6	>1000	0,72	-	>1000	0,63	-
31,2	700±160	0,38	-24±2	530±130	0,67	-25±2
46,8	160±30	0,35	-25±3	80±20	0,36	-23±4

При низкой мощности ультразвукового воздействия и при небольшом времени обработки (10 мин) частицы образовали крупные агрегаты (Табл. 3). Стабильная суспензия частиц небольшого гидродинамического диаметра могла быть получена как при увеличении мощности, так и времени обработки. Величины ζ-потенциала при этом были практически одинаковы.

Табл. 3. Характеристики частиц, полученных при разных временах ультразвуковой обработки.

Мощность	80 Вт		120 Вт		200 Вт	
	d, нм	ζ, мВ	d, нм	ζ, мВ	d, нм	ζ, мВ
10	-	-	-	-	1100±400	-
20	170±10	-25±2	120±5	-24±1	80±20	-25±1
30	100±5	-24±3	85±5	-24±2	80±15	-26±2

В результате были выбраны два способа синтеза частиц при мощности ультразвукового воздействия 200 Вт и длительности обработки 20 мин: А – без охлаждения, Б – с охлаждением (Табл. 4).

Табл. 4. Условия синтеза СаР-частиц и характеристики получаемых в результате частиц

Методика	d, нм	PDI	ζ, мВ	рН(гидрофосфат)	С(цитрат), мМ
А	80±20	0,19	-25±2	8,8	15,6
Б	80±20	0,36	-23±4	7,0	46,8

ПЭМ-изображения СаР-частиц, полученных по методике А, продемонстрировали, что, в основном, частицы имели удлиненную «стержневую» структуру (Рис. 1А). Размер СаР-частиц (30-200 нм) соответствовал среднему гидродинамическому диаметру, определенному с помощью ДСР (Табл. 5).

Табл. 5. Физико-химические свойства образца СаР-частиц, полученных по методике А.

Параметр	Метод анализа	Значение
d, нм	ДСР	80±20
	ПЭМ	30-150
Площадь поверхности, м ² /г	БЭТ	185
Размер пор, нм	БЭТ	13±2
Фазовый состав	РФА	Гексагональный гидроксиапатит + аморфный фосфат кальция

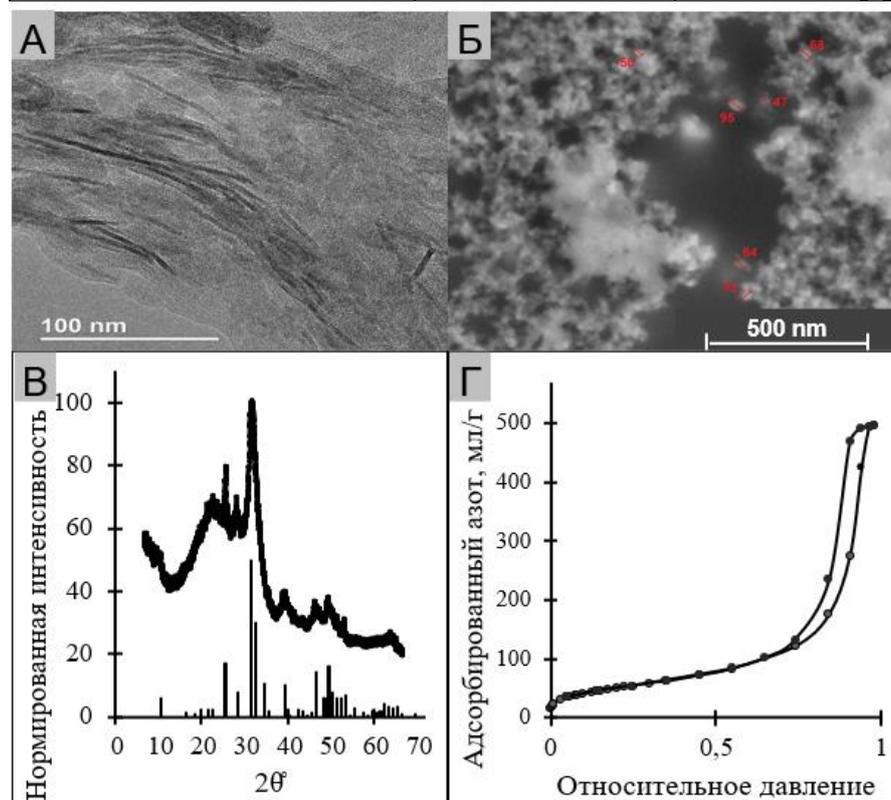


Рис. 1.
 А) ПЭМ-изображение СаР-частиц (методика А);
 Б) РЭМ-изображение СаР-частиц (методика Б). Частицы для В, Г получены по методике А.
 В) Дифрактограмма образца СаР-частиц;
 Г) изотерма сорбции азота на СаР-частицах.

Анализ рентгеновской дифрактограммы СаР-частиц показал, что частицы в основном представляли собой гексагональную модификацию гидроксиапатита (рис. 1В) и аморфную фазу. Частицы имели развитую поверхность (Табл. 5) и характеризовались мезопористостью, так как присутствовала петля гистерезиса сорбции-десорбции азота (Рис. 1Г).

СаР-частицы, полученные по методике Б, имели округлую форму с размером 45-95 нм, что также согласуется с данными ДСР (Рис.1Б, Табл. 4). По-видимому, различия в форме СаР-частиц, полученных в разных условиях, связаны с фазовым составом образцов: вытянутую форму имеют СаР-частицы (Рис. 1Б), полученные по методике А и обладающие кристаллической структурой гидроксиапатита, а частицы, обладающие округлой формой, могут соответствовать аморфной фазе фосфата кальция.

2. Получение и характеристика гибридных частиц на основе фосфата кальция и хитозана

Значительным ограничением использования хитозана является его растворимость только при низких значениях pH. Поэтому для работы нами были выбраны два вида хитозана, способных растворяться в нейтральной и слабокислой среде: олигосахарид хитозан со средней молекулярной массой 5 кДа в форме лактата (растворялся при pH<6), а также гликоль-хитозан со средней молекулярной массой 72 кДа (растворялся при pH<7,5) (Рис. 2).

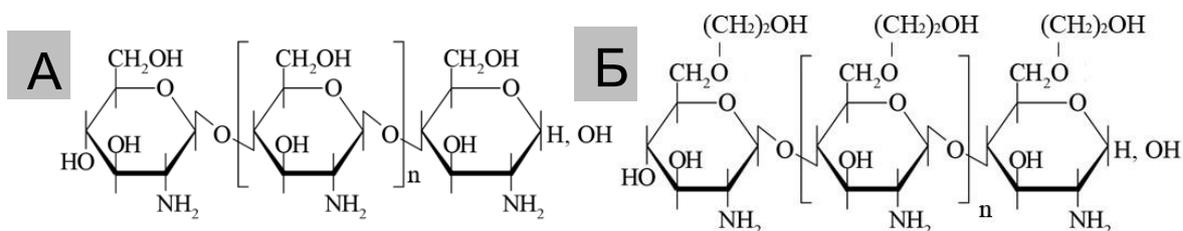


Рис. 2. Структуры А) 5 кДа хитозана, Б) 72 кДа гликоль-хитозана.

Для подбора условий покрытия мы использовали СаР-частицы, полученные по методике А. Варьировали pH среды и соотношение ТПФ:хитозан. Основным критерием выбора условий был сдвиг ζ-потенциала частиц в положительную область, свидетельствующий о покрытии СаР-частиц. В результате были выбраны pH 5,7 при покрытии частиц 5 кДа хитозаном и pH 6,8 покрытия гликоль-хитозаном (Табл. 6).

Табл. 6. Подбор pH системы для покрытия СаР-частиц хитозанами. Соотношение ТПФ:хитозан=0,2:1.

СаР-частицы/5 кДа хитозан				СаР-частицы/гликоль-хитозан			
pH	d, нм	PDI	ζ, мВ	pH	d, нм	PDI	ζ, мВ
5,3	50±20	0,69	+16±1	5,7	80±5	0,61	+10±1
5,7	160±25	0,21	+11±2	6,8	240±10	0,25	+20±3
6,0	170±30	0,94	-25±1, +24±2	7,2	185±10	0,37	+8±1

Низкое соотношение ТПФ:хитозан практически не позволяло покрыть СаР-частицы хитозанами. Оптимальным соотношением для обоих видов хитозана оказалось 0,2:1 (Табл. 7). Дальнейшее увеличение соотношения ТПФ:хитозан приводило к агрегации частиц.

Табл. 7. Подбор соотношения ТПФ:хитозан для двух видов хитозана

ТПФ:хитозан	СаР-частицы/5 кДа хитозан		СаР-частицы/Гликоль-хитозан	
	d, нм	ζ, мВ	d, нм	ζ, мВ
0,1:1	80±15	+5±1	80±15	+9±2
0,15:1	115±25	+10±1	90±10	+16±5
0,2:1	160±25	+12±2	240±10	+20±2
0,25:1	390±40	+7±2	>1000	-
1:1	600±50	+8±2	>1000	-

Гибридные частицы, состоящие из ядра фосфата кальция и хитозанового покрытия, в отличие от исходных СаР-частиц обладали положительным ζ -потенциалом, который был выше в случае покрытия гликоль-хитозаном (Табл. 8). Покрытые 5 кДа хитозаном СаР-частицы на изображениях РЭМ имели размер около 150 нм (Рис. 3А), что согласуется со значениями, полученными методом ДСР, и форму стержня, подобную непокрытым частицам (Рис. 1А). Покрытые гликоль-хитозаном СаР-частицы имели сферическую форму и размер 110-400 нм (Рис. 3Б), что согласуется с данными ДСР.

Табл. 8. Физико-химические свойства гибридных частиц (СаР-частицы получены без охлаждения)

Параметр	Метод анализа	Значение	
		СаР-частицы/5 кДа хитозан	СаР-частицы/Гликоль-хитозан
d, нм	ДСР	160±25	240±20
	РЭМ	30-200	110-400
ζ , мВ	ДСР	+12±2	+20±3
Эффективность покрытия, %	Спектрофотометрия	13±2	45±1
Фазовый состав	РФА	Аморфный фосфат кальция + гексагональный гидроксиапатит	Аморфный фосфат кальция + гексагональный гидроксиапатит

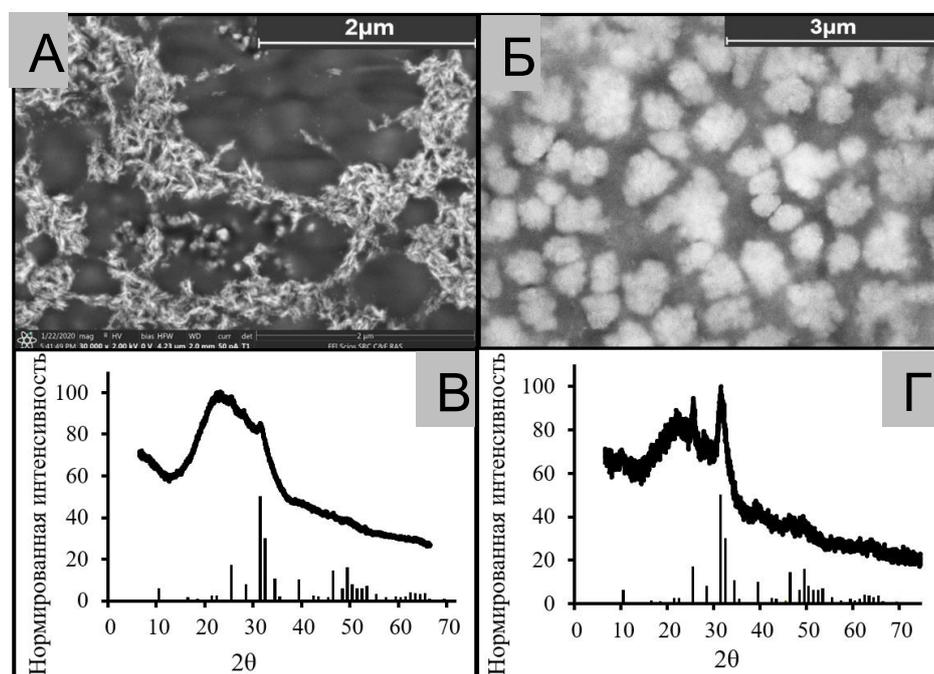


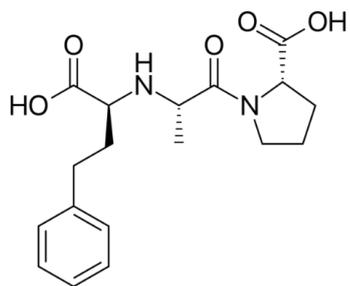
Рис. 3. Верхний ряд: РЭМ-изображения СаР-частиц, покрытых А) 5 кДа хитозаном, Б) гликоль-хитозаном. Нижний ряд: дифрактограммы СаР-частиц, покрытых В) 5 кДа хитозаном, Г) гликоль-хитозаном. Линии представляют теоретический спектр для гексагональной модификации гидроксиапатита.

Исследование фазового состава гибридных частиц методом РФА (Рис. 3В, Г) показало, что образцы состоят из гексагонального гидроксиапатита и аморфного фосфата кальция.

Полученные гибридные частицы были стабильны при хранении в исходной суспензии при 4°C, при ее концентрировании и разбавлении, а также в присутствии 0,15М NaCl.

3. Включение препаратов в гибридные частицы

Получение и характеристика гибридных частиц с включенным эналаприлатом



В качестве первого соединения для инкапсулирования в частицы мы выбрали низкомолекулярный ингибитор АПФ эналаприлат (Рис. 4). Использовали два подхода: сорбцию препарата на готовых непокрытых и покрытых хитозаном частицах и включение препарата на стадии синтеза СаР-частиц (соосаждение) с последующим покрытием хитозаном.

Рис. 4. Структура эналаприлата (348 Да)

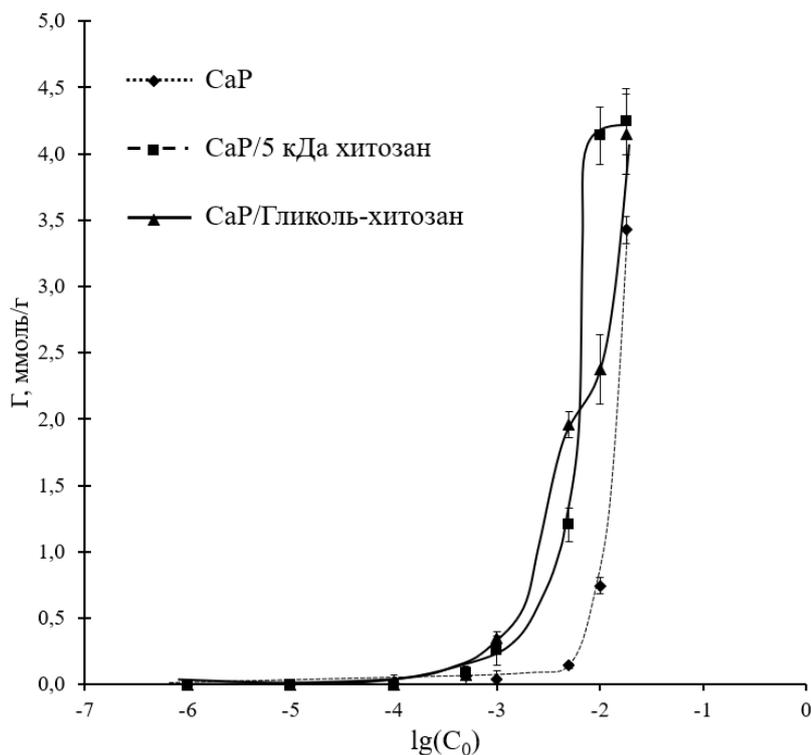


Рис. 5. Изотерма сорбции эналаприлата на непокрытых и покрытых хитозанами СаР-частицах. Г – количество вещества эналаприлата на 1 г СаР- и гибридных частиц

Данные по сорбции эналаприлата на гибридных и СаР-частицах представлены на рис. 5. Изотерма сорбции эналаприлата на непокрытых СаР-частицах относится к изотермам III типа, на покрытых 5 кДа хитозаном – IV, на покрытых гликоль-хитозаном – II типа по классификации Брунауэра. Изотермы II и IV типа характерны для систем с высокой энергией взаимодействия адсорбируемого вещества и носителя, а III и V типа – с более сильным взаимодействием адсорбат — адсорбат.

Включение эналаприлата в непокрытые СаР-частицы при использовании метода соосаждения оказалось в два раза эффективнее ($40 \pm 10\%$), чем при использовании метода сорбции ($19 \pm 4\%$). В случае включения эналаприлата в СаР-частицы, покрытые 5 кДа хитозаном, процент инкапсуляции составлял $66 \pm 5\%$, в то время как при сорбции лишь $37 \pm 7\%$. Эффективность включения эналаприлата в частицы, покрытые гликоль-хитозаном, составила $72 \pm 8\%$ при соосаждении и $63 \pm 4\%$ при сорбции. По-видимому, высокий поверхностный заряд покрытых гликоль-хитозаном СаР-частиц (+20 мВ) позволяет отрицательно заряженному эналаприлату эффективно взаимодействовать с частицами, обеспечивая высокую загрузку препарата не только при соосаждении, но и при сорбции.

Включение эналаприлата в непокрытые CaP-частицы практически не изменяло гидродинамический диаметр частиц, но несколько понижало их ζ -потенциал по сравнению с пустыми с -25 мВ до -31 мВ (Табл. 9). Включение эналаприлата в гибридные частицы приводило к увеличению гидродинамического диаметра, а также к некоторому снижению поверхностного заряда относительно пустых гибридных частиц с +12 мВ до +7 мВ в случае 5 кДа хитозана и с +20 до +16 мВ в случае гликоль-хитозана (Табл. 9). Однако частицы оставались положительно заряженными, что требуется для адгезии частиц к роговице.

Табл. 9. Характеристики частиц с включёнными препаратами.

Частицы	d, нм	PDI	ζ , мВ	Включение препарата, %			
				Эналаприлат		СОД1	
				%	Мкг/мг частиц	%	Мкг/мг частиц
CaP/Эналаприлат	110±20	0,2	-31±3	40±10	240±25	-	-
CaP/Эналаприлат/5 кДа хитозан	180±30	0,25	+7±3	66±5	340±20	-	-
CaP/Эналаприлат/ Гликоль-хитозан	260±30	0,27	+16±3	72±8	360±30	-	-
CaP/СОД1/5 кДа хитозан	170±20	0,47	+22 ±1	-	-	64±3	110±5
CaP/СОД1+эналаприлат /5 кДа хитозан	140±20	0,43	+20±1	56±6	300±20	30±2	40±3

Отметим, что суспензия непокрытых CaP-частиц с включенным эналаприлатом была нестабильной: у частиц за 1 месяц увеличивался гидродинамический диаметр (со 100 до 350 нм) и падал по модулю ζ -потенциал (с -31 до -8 мВ), однако покрытие частиц хитозаном приводило к их стабилизации.

Получение и характеристика гибридных частиц с включенной супероксиддисмутазой 1

Вторым соединением для включения в частицы была выбрана СОД1 (32,5 кДа). Включение СОД1 в CaP-частицы осуществляли методом соосаждения. Несмотря на то, что СОД1 сохраняла активность в течение 1 часа при 60°C, нам не удалось получить СОД1-содержащие CaP-частицы по методике А (Табл. 4), поскольку в процессе синтеза наблюдалось образование пены, а фермент не включался в состав частиц. Вследствие этого CaP-частицы с включенной СОД1 получали по методике Б при охлаждении (Табл. 4). Получаемые частицы также были нестабильны, поэтому их сразу же покрывали 5 кДа хитозаном. В результате были получены стабильные частицы с высоким процентом включения СОД1 (Табл. 9). Активность СОД1 в суспензии гибридных частиц 9,3±0,3 кУ/мл. Частицы с СОД1 и хитозановым покрытием характеризовались более высоким ζ -потенциалом (+22 мВ), чем пустые CaP-

частицы, покрытые 5 кДа хитозаном (+12 мВ). При этом гидродинамический диаметр пустых частиц и частиц с включенной СОД1 практически не различался.

Получение и характеристика гибридных частиц с совместно включенными препаратами

Включение препаратов в частицы проводили методом соосаждения при ультразвуковой обработке в условиях включения СОД1 (по методике Б – Табл. 4). Анализ методом ДСР показал, что гидродинамический диаметр частиц незначительно меньше (140 нм), чем диаметр частиц, содержащих только СОД1 (170 нм). Высокий поверхностный заряд полученных частиц +20 мВ свидетельствовал об эффективном покрытии частиц хитозаном, при этом он совпал с ζ -потенциалом гибридных частиц, в которые включена только СОД1 (Табл. 9). При совместном включении содержание СОД1 сократилось с 64% до 30%, в то время как содержание эналаприлата практически не изменилось.

Для демонстрации присутствия СОД1, эналаприлата и 5 кДа хитозана в составе полученных частиц были предварительно получены ИК-спектры препаратов с той же концентрацией, в которой они присутствовали в составе частиц, и их сравнили с ИК-спектрами частиц. После покрытия СаР-частиц хитозаном происходило резкое снижение интенсивности в области поглощения валентных колебаний фосфатной группы, а также увеличение интенсивности пика поглощения, соответствующего колебаниям связей С–N в хитозане, что указывало на взаимодействие СаР-частиц с хитозановой оболочкой. Включение СОД1 и эналаприлата в СаР-частицы и гибридные частицы приводило к значительному увеличению интенсивности в областях колебаний амида I и амида II, принадлежащих СОД1, и колебаний ароматической структуры эналаприлата. Таким образом, анализ всех спектров продемонстрировал наличие 5 кДа хитозана в гибридных частицах, а также присутствие СОД1 и эналаприлата в непокрытых СаР-частицах и гибридных частицах.

4. Высвобождение препаратов из гибридных частиц *in vitro*

Кинетику высвобождения препаратов из гибридных частиц в сравнении с непокрытыми СаР-частицами изучали при инкубации частиц в физиологическом растворе, рН 7,5. Из непокрытых СаР-частиц эналаприлат высвобождался более чем на 60% за 5 минут (Рис. 6А), а за 90 минут эналаприлат высвобождался полностью. Скорость высвобождения эналаприлата из гибридных частиц была значительно меньше, чем из непокрытых СаР-частиц. При этом скорость высвобождения препарата в случае гликоль-хитозана была выше, чем в случае 5 кДа хитозана, а полное высвобождение эналаприлата из гибридных частиц достигалось только при смене элюирующего раствора (Рис. 6А).

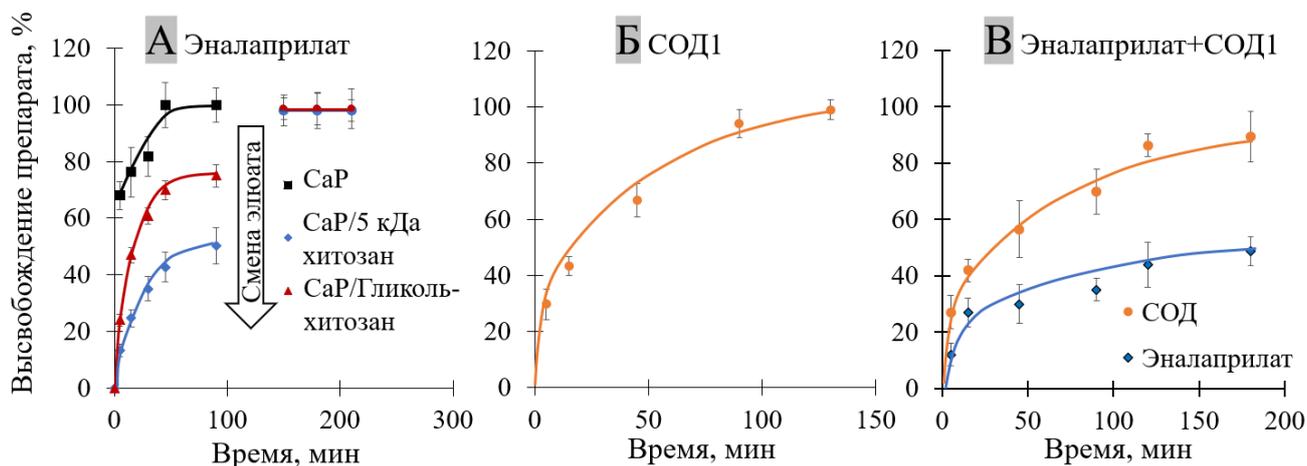


Рис. 6. Кинетика высвобождения препаратов из CaP-частиц и гибридных частиц при инкубации в физиологическом растворе: А) эналаприлата из непокрытых и покрытых 5 кДа хитозаном и гликоль-хитозаном CaP-частиц; Б) СОД1 из CaP-частиц, покрытых 5 кДа хитозаном; В) СОД1 и эналаприлата при совместном включении из CaP-частиц, покрытых 5 кДа хитозаном.

При исследовании СОД1-содержащих гибридных частиц оказалось, что за первые 5 минут в раствор переходило около 30% фермента. Вероятно, в раствор переходил фермент, сорбированный в приповерхностных слоях частиц. Затем наклон кривой уменьшался, что говорит о более медленном высвобождении препарата из ядра частиц вплоть до 100% через 130 минут (Рис. 6Б).

В случае совместно включенных в частицы СОД1 и эналаприлата около 30% СОД1 быстро переходила в раствор за первые 5 минут, затем высвобождение немного замедлялось, как и в случае с десорбцией фермента из частиц, содержащих только СОД1 (Рис. 6Б, В). Эналаприлат лучше удерживался в частицах по сравнению с СОД1, плавно вымываясь из частиц и достигая состояния равновесия при проценте высвобождения около 50%, что хорошо коррелировало с высвобождением одиночно включенного препарата (Рис. 6А, В).

Для изучения механизма высвобождения эналаприлата и СОД1 из частиц полученные данные были аппроксимированы с использованием различных математических моделей. Наиболее подходящей моделью для описания высвобождения препаратов из всех образцов частиц является модель Корсмейера-Пеппаса. Эта модель указывает на диффузионно-контролируемое высвобождение препарата из разработанной наносистемы. Значение параметра n – показатель степени диффузионного высвобождения (при $n \leq 0,45$ характерна фиковская диффузия, а $0,45 < n < 1$ – нефиковская диффузия) отражает вклад процессов диффузии и десорбции в кинетику высвобождения: то есть увеличение « n » указывает на возрастающую роль диффузии.

5. Препараты в составе гибридных частиц в экспериментах *in vivo*

Эксперименты *in vivo* проводили совместно с Институтом Глазных Болезней имени Гельмгольца на нормотензивных кроликах. Все эксперименты с кроликами были проведены в

строгом соответствии с положением Ассоциации исследований в области зрения и офтальмологии по использованию животных в офтальмологических исследованиях. Протокол был одобрен Комитетом по этике по экспериментам с животными Института глазных болезней им. Гельмгольца (Номер разрешения 22/2). Были приложены все усилия для минимизации страдания кроликов. В экспериментах на животных производили оценку удерживания препаратов в слезной жидкости и оценку снижения ВГД в результате инстилляций препаратов в составе частиц и в форме раствора. Каждая серия экспериментов по удерживанию препаратов в слезной жидкости и снижению ВГД имела по крайней мере три повтора в каждый период времени. Следует подчеркнуть, что после получения частиц их не отделяли от препарата в растворе

Определение «времени жизни» эналаприлата и СОД1 в слезной жидкости после инстилляций в суспензии частиц и в растворе

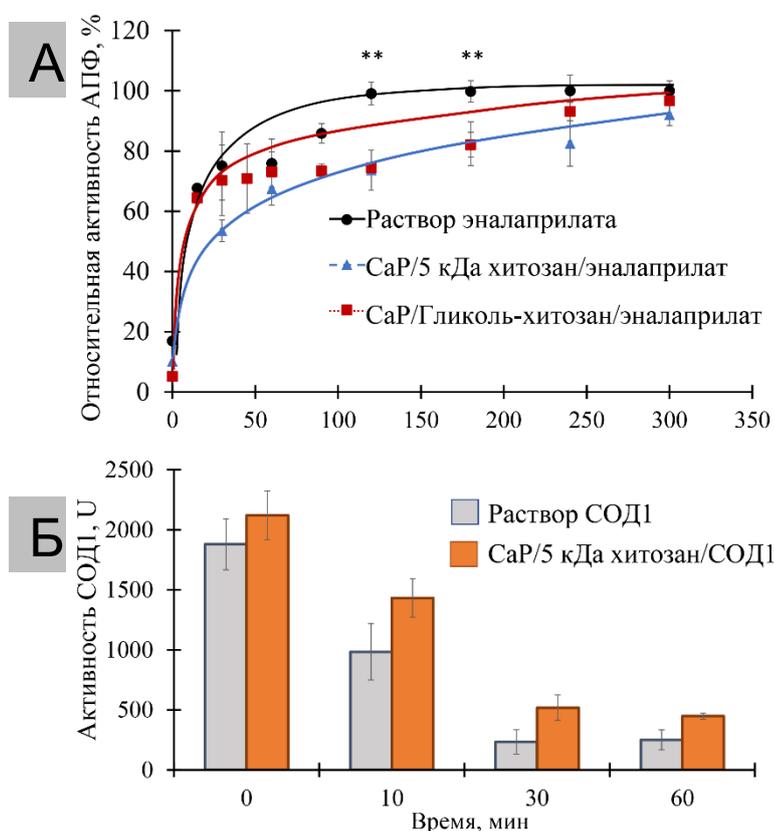


Рис. 7. Содержание А) эналаприлата и Б) СОД1 в слезной жидкости кроликов после однократной инстилляцией препарата (каждая группа по 3 кролика – 6 глаз). На рис. приведены усредненные данные из 3 экспериментов.

Мы сравнили временные профили обнаружения эналаприлата в слезе после однократной инстилляцией свободного эналаприлата и эналаприлата в суспензии CaP-частиц, покрытых двумя видами хитозана. Относительное содержание эналаприлата в слезной жидкости оценивали по его способности ингибировать контрольный АПФ, то есть чем больше была активность АПФ, тем меньше эналаприлата в среде. Оказалось, что в то время, как при внесении эналаприлата в виде раствора препарат не обнаруживался в слезе через 2 часа после инстилляцией, при внесении эналаприлата в составе гибридных частиц в слезе обнаруживалось

около 20 нМ эналаприлата (Рис. 7А). Таким образом, включение эналаприлата в CaP-частицы, покрытые хитозаном, способствовало увеличению времени его жизни в слезной жидкости.

Активность СОД1, закапываемой в составе суспензии гибридных частиц, в слезе оказалась выше через 10 минут после инстилляций, чем активность СОД1, вносимой в виде раствора (Рис. 7Б). Некоторая активность СОД1 в слезной жидкости была обнаружена также через полчаса после инстилляций суспензии гибридных частиц, но не свободной СОД1. Таким образом, включение как эналаприлата, так и СОД1, в покрытые хитозаном СаР-наночастицы способствовало увеличению времени их удерживания в слезной жидкости, по-видимому, за счет удерживания гибридных частиц на поверхности роговицы.

Определение влияния эналаприлата и СОД1 в составе гибридных частиц на внутриглазное давление

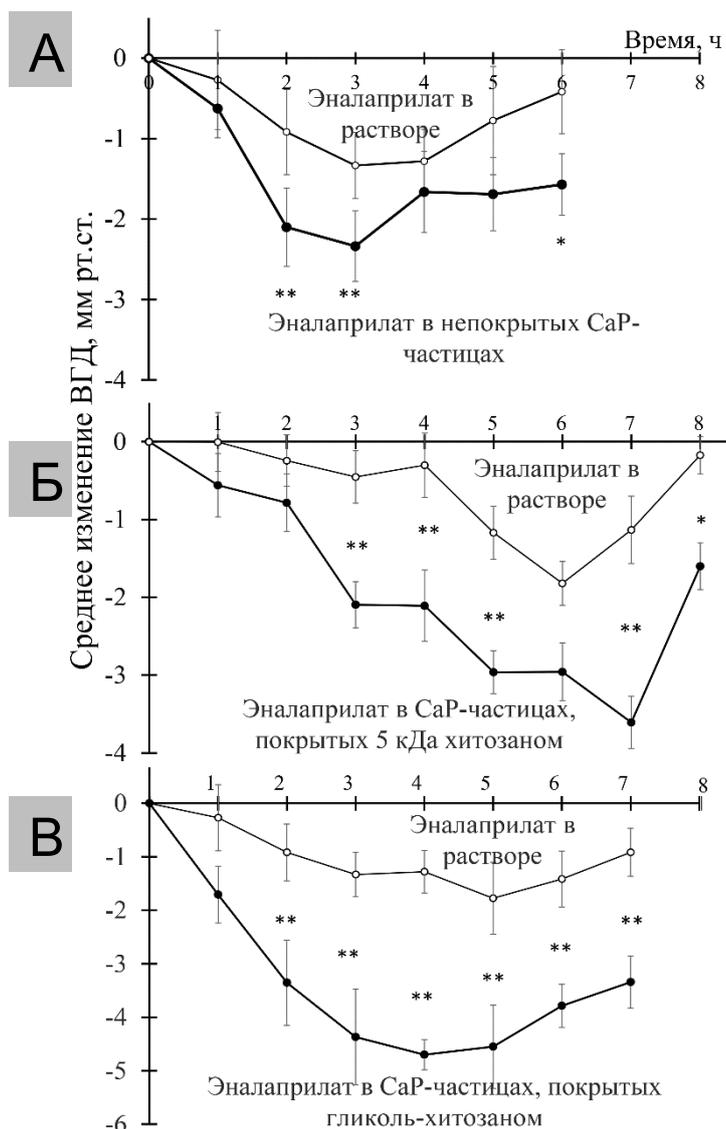


Рис. 8. Снижение ВГД у кроликов после однократной инстилляций эналаприлата в водной форме и: А) в составе СаР-частиц; Б) в составе СаР-частиц, покрытых 5 кДа хитозаном; В) в составе СаР-частиц, покрытых гликоль-хитозаном. * – $U_{эмп} \leq U_{0,05}$, ** – $U_{эмп} \leq U_{0,01}$ (различия между значениями снижения ВГД достоверны).

Эксперименты *in vivo* проводились в течение нескольких лет на различных партиях лабораторных животных. Для экспериментов по снижению ВГД использовали эналаприлат-содержащие СаР- и гибридные частицы, а также контрольный раствор с идентичной концентрацией эналаприлата в фосфатном буфере. Значение ВГД для интактных кроликов измеряли после местного введения суспензии пустых СаР-частиц.

На рис. 8 представлены усредненные данные по снижению ВГД после однократной инстилляций кроликам суспензии непокрытых СаР-частиц (Рис. 8А) и гибридных частиц (Рис. 8Б, В) с включенным эналаприлатом, а также эналаприлата в растворе. Препарат в составе гибридных и СаР-частиц вызывал существенно большее снижение ВГД, чем препарат в растворе. Важно, что если после закапывания водного раствора эналаприлата величина ВГД через 7-8 часов возвращалась к исходным значениям, то при

инстилляций препарата, включенного в частицы, статистически достоверное понижение ВГД наблюдалось даже спустя 8 часов. Эналаприлат в составе гибридных частиц вызывал более сильное снижение ВГД, чем в составе непокрытых СаР-частиц. Вероятно, это связано с тем, что покрытые хитозаном частицы имеют положительный ζ -потенциал (Табл. 9), и, следовательно, обладают большим сродством к отрицательно заряженным клеткам роговицы, чем непокрытые частицы. Эналаприлат в составе частиц, покрытых гликоль-хитозаном, оказывал наибольшее влияние на ВГД.

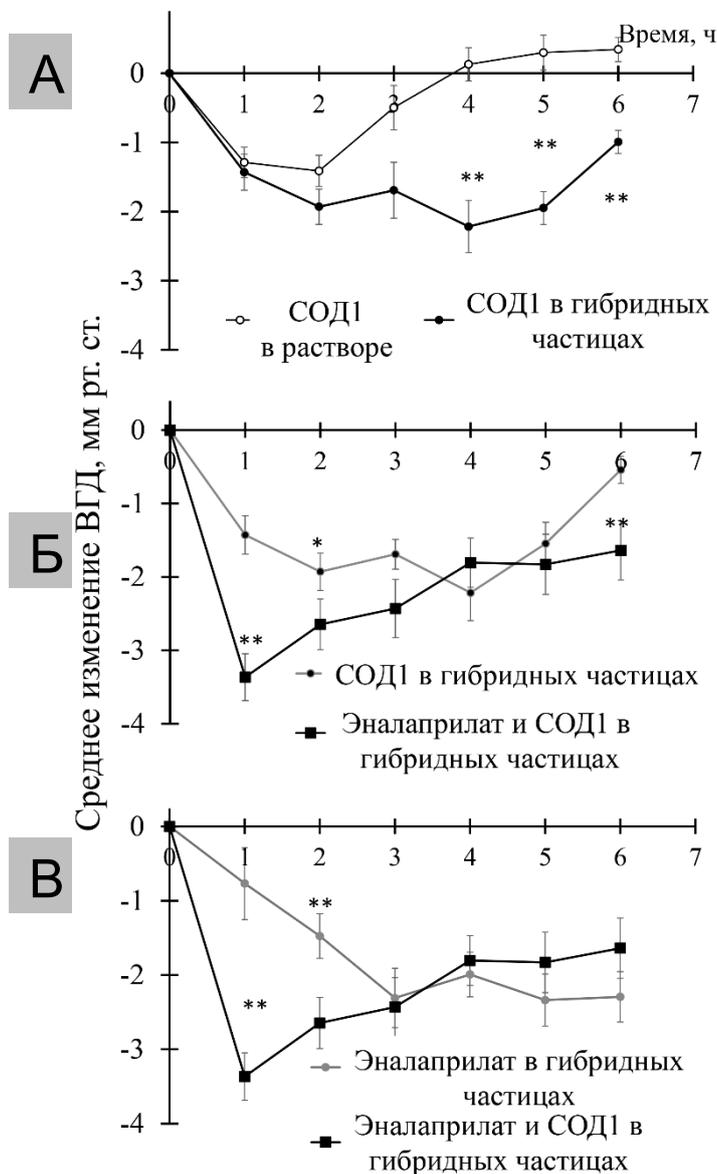


Рис. 9. Снижение ВГД у кроликов под действием А) СОД1 в составе гибридных частиц и СОД1 в растворе; Б) СОД1 в составе гибридных частиц и совместно эналаприлата и СОД1 в составе гибридных частиц, В) эналаприлата в составе гибридных частиц и совместно эналаприлата и СОД1 в составе гибридных частиц. Области значений U-критерия Манна-Уитни: * – $U_{\text{эмп}} \leq U_{0,05}$, ** – $U_{\text{эмп}} \leq U_{0,01}$ (различия между значениями снижения ВГД достоверны).

Для изучения влияния включения СОД1 в гибридные частицы на ВГД использовали суспензию покрытых 5 кДа хитозаном СаР-частиц с включенной СОД1, а также контрольный раствор СОД1 с идентичной концентрацией. Применение СОД1 как в форме раствора, так и в составе гибридных частиц приводило к падению ВГД уже спустя 1 час после инстилляций, но через 3-4 часа значения ВГД возвращались к исходному при использовании раствора СОД1, в то время как ВГД у кроликов, которым инстиллировали СОД1 в гибридных частицах, оставалось сниженным вплоть до 6 часов (Рис. 9А). При инстиляции совместно включенных эналаприлата и СОД1 в гибридных частицах происходило резкое падение ВГД на 3,5 мм рт.ст через час после закапывания (Рис. 9В, Г). При этом падение ВГД при использовании отдельно включенных в гибридные частицы СОД1 и эналаприлата приводило к падению на 0,8 и 1,4 мм рт.ст, соответственно. Если бы можно было суммировать эти эффекты, сумма соответствовала бы 2,2 мм рт. ст. Таким образом, в первый час после

инстилляций СОД1 и эналаприлат, совместно включенные в гибридные частицы, оказывали некоторый синергический эффект на ВГД, который, по-видимому, обусловлен различными физиологическими механизмами действия СОД1 и эналаприлата.

6. Хитозановые частицы, содержащие эналаприлат

Поскольку мы показали, что применение эналаприлата в составе гибридных частиц приводило к более сильному гипотензивному эффекту, чем в составе непокрытых СаР-частиц, мы решили изучить возможность включения эналаприлата в хитозановые частицы. Поскольку концентрация хитозана, достаточная для покрытия СаР-частиц, для синтеза стабильных хитозановых частиц оказалась мала, концентрацию хитозана повышали в 2,7-5,3 раза.

Для синтеза варьировали значение рН среды и соотношение ТПФ:хитозан, характеристики частиц представлены в Табл. 10.

Табл. 10. Сравнительные характеристики пустых хитозановых частиц и частиц, содержащих эналаприлат.

Частицы	Препарат	d, нм	PDI	ζ, мВ	% включения
5 кДа хитозан	-	110±20	0,2	+23±2	-
	Эналаприлат	105±20	0,16	+21±3	25±4
Гликоль-хитозан	-	250±10	0,19	+19±2	-
	Эналаприлат	460±20	0,16	+10±2	41±3

Поверхностный заряд частиц, образованных 5 кДа хитозаном (Табл. 11) был значительно выше, чем у соответствующих гибридных (Табл. 8), а гидродинамический диаметр был меньше. В случае гликоль-хитозана гидродинамический диаметр и ζ-потенциал хитозановых и гибридных частиц практически не отличались (Табл. 8, 10).

Включение эналаприлата осуществляли при получении хитозановых частиц. Процент включения препарата в 5 кДа хитозановые частицы был значительно ниже (25%) по сравнению с гибридными (66%), поэтому включение эналаприлата в частицы не привело к существенному изменению их характеристик (Табл. 10). Включение эналаприлата в гликоль-хитозановые частицы было эффективнее (41%) и привело к значительному падению ζ-потенциала частиц и увеличению их среднего гидродинамического диаметра (Табл. 10).

Первоначальное высвобождение эналаприлата из хитозановых частиц происходило очень быстро: за 15 минут инкубации из 5 кДа хитозановых частиц высвободилось около 40% включенного препарата, а из гликоль-хитозановых частиц около 30% (Рис. 10), по-видимому, за счет начальной десорбции эналаприлата с поверхности частиц. Дальнейшее высвобождение происходило хуже, даже после 3 смен физраствора удалось добиться только 80% высвобождения препарата из 5 кДа хитозановых частиц и 60% из гликоль-хитозановых. Такое удерживание препарата может объясняться сильным электростатическим взаимодействием между отрицательно заряженными карбоксильными группами эналаприлата и положительно

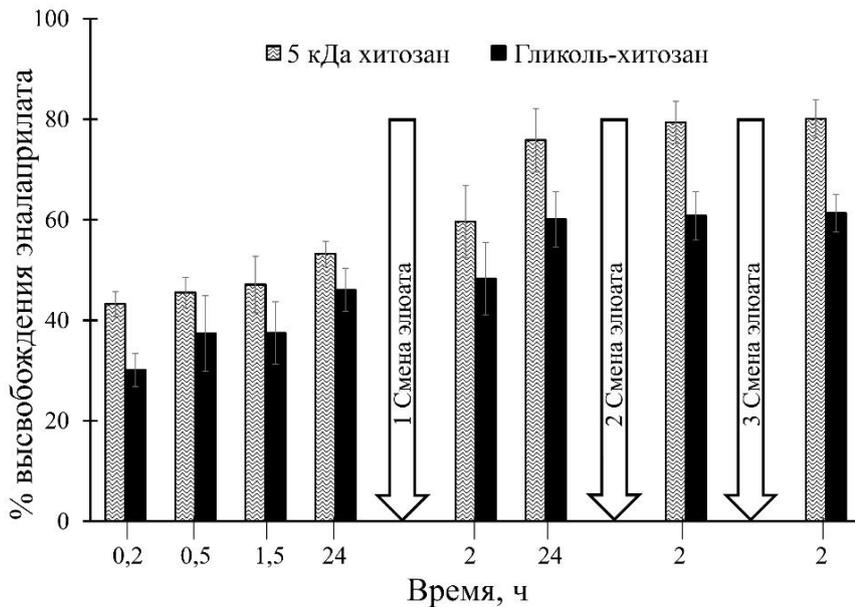


Рис. 10. Высвобождение эналаприлата из хитозановых частиц при инкубации в физиологическом растворе

заряженными аминогруппами хитозана. Таким образом, эналаприлат гораздо сильнее удерживался в хитозановых частицах, чем в гибридных. Наиболее подходящей моделью для описания высвобождения эналаприлата из хитозановых частиц является модель Корсмейра-Пеппаса, при этом значение «n» соответствует фиковской диффузии.

Определение «времени жизни» эналаприлата в слезной жидкости после инстилляций в суспензии частиц и в растворе

Эксперименты *in vivo* показали, что включение эналаприлата в хитозановые частицы, так же, как и в гибридные, позволило значительно увеличить время удерживания препарата в слезной жидкости (Рис. 11). По-видимому, увеличение времени нахождения в слезе эналаприлата при инстиляции в составе частиц любого вида обеспечивалось именно хитозаном. Таким образом, хитозановые частицы могут длительное время удерживаться на поверхности глаза, способствуя тем самым длительному удерживанию препарата в слезе.

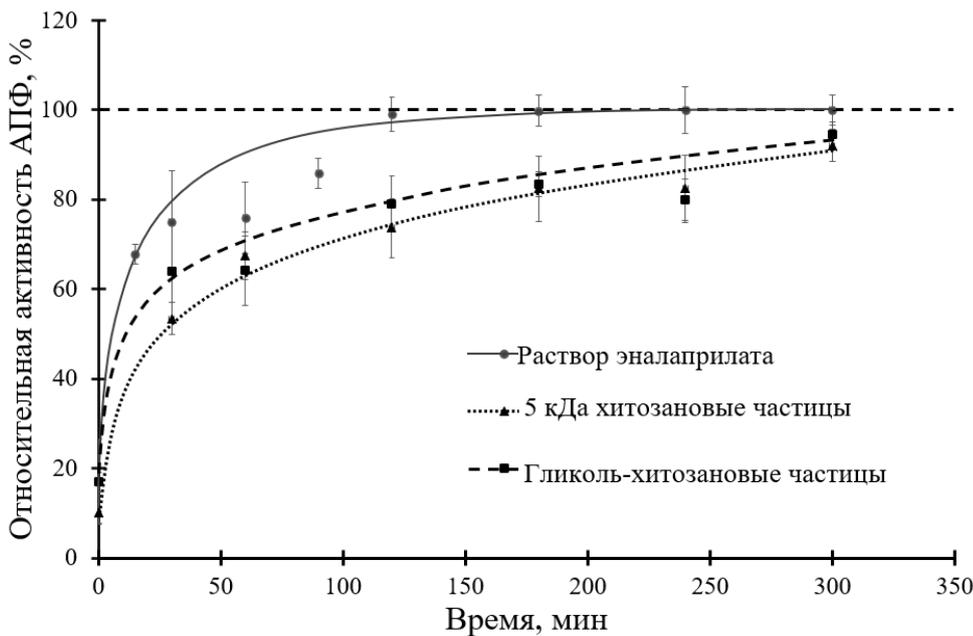


Рис. 11. Удерживание эналаприлата в слезной жидкости кроликов после однократной местной инстиляции.

Сравнение влияния эналаприлата в составе гибридных и хитозановых частиц на внутриглазное давление

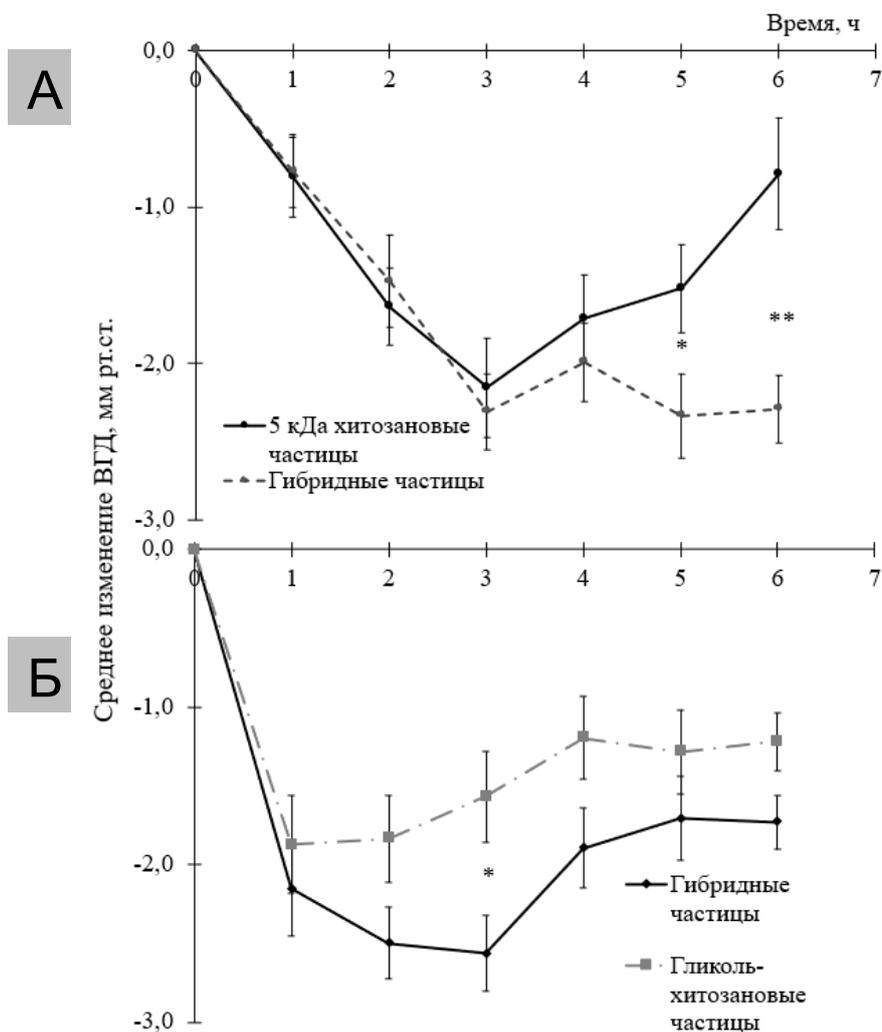


Рис. 12. Падение ВГД у кроликов после однократной инстилляцией эналаприлата в составе А) СаР-частиц, покрытых 5 кДа хитозаном (гибридные частицы), и в составе 5 кДа хитозановых частиц; Б) СаР-частиц, покрытых гликоль-хитозаном (гибридные частицы), и в составе гликоль-хитозановых частиц * – $U_{эмп} \leq U_{0,05}$, ** – $U_{эмп} \leq U_{0,01}$ (различия между значениями падения ВГД достоверны).

На рис. 12А представлены усредненные данные, полученные в результате трех серий экспериментов по снижению ВГД при инстилляциях в глаза кроликов эналаприлата в составе суспензии 5 кДа хитозановых частиц и в составе СаР-частиц, покрытых 5 кДа хитозаном. Оказалось, что до 4 часов после инстилляцией данные по падению ВГД под действием эналаприлата в разных видах частиц были статистически неразличимы, однако затем эналаприлат в составе гибридных частиц оказывал более длительное действие на снижение ВГД (Рис. 12А). Казалось бы, из-за более высокого ζ -потенциала хитозановых частиц (+21 мВ против +7 мВ у гибридных) они должны лучше удерживаться на поверхности глаза и, соответственно, сильнее и дольше снижать ВГД под действием включенного в них эналаприлата. По-видимому, более высокий процент включения (66% в гибридные и 25% в хитозановые частицы) и более эффективное высвобождение эналаприлата из гибридных частиц обеспечивали и более эффективное снижение ВГД по сравнению с хитозановыми частицами.

На рисунке 12Б представлены усредненные данные, полученные в результате трех серий экспериментов по снижению ВГД при инстилляциях в глаза кроликов эналаприлата в составе суспензии 72 кДа гликоль-хитозановых частиц и в составе СаР-частиц, покрытых 72 кДа гликоль-хитозаном. В результате инстилляцией эналаприлата в составе хитозановых частиц

происходило резкое падение ВГД на 1,9 мм рт.ст. через 1 час после инстилляции, затем ВГД несколько повышалось, но все равно оставалось пониженным в течение 6 часов после инстилляции. Эналаприлат в составе гибридных частиц также вызывал резкое падение ВГД, которое продолжало снижаться в течение трех часов после инстилляции. В целом, падение ВГД под действием эналаприлата в гибридных частицах было более глубоким, чем в хитозановых частицах (Рис. 12Б). Следует отметить, однако, что данные по падению ВГД при инстилляциях гликоль-хитозановых и гибридных частиц были более схожи, чем в случае использования 5 кДа хитозана, что, по-видимому, связано с несколькими параметрами – близкими процентами включения препарата (41% в хитозановые и 72% в гибридные), а также не сильно различающимися значениями ζ -потенциала (+10 мВ и +17 мВ).

Заключение

В результате проделанной работы нам удалось получить гибридные частицы на основе фосфата кальция, покрытого хитозаном, с высоким процентом включения препаратов, а именно 30-72%, которые при этом стабильны при хранении в суспензии в течение месяца без добавления консервирующих агентов. Несмотря на то, что включение ингибитора АПФ и СОД1 в непокрытые СаР-частицы уже улучшало их фармакологические свойства, покрытие СаР-частиц хитозаном приводило к еще большему улучшению этих свойств. Кроме того, покрытие частиц хитозаном улучшает их стабильность при хранении. Включение эналаприлата и СОД1 в гибридные частицы позволило добиться значительного увеличения времени удерживания препаратов в слезной жидкости, а также усиления и пролонгации их гипотензивного действия. По-видимому, смещение ζ -потенциала СаР-частиц в положительную область за счет покрытия хитозаном позволило улучшить их адгезию к роговице глаза, что препятствует их смыву слезной жидкостью. Такие частицы в течение продолжительного времени могут поставлять лекарственный препарат во внутренние области глаза, поддерживая его концентрацию на уровне, достаточном для снижения ВГД. Показано, что включение эналаприлата в хитозановые частицы также способствовало усилению его терапевтического действия, но гибридные частицы представляются более эффективными.

ВЫВОДЫ

1. Оптимизированы методики синтеза СаР-частиц с гидродинамическим диаметром 80 ± 20 нм и ζ -потенциалом -25 ± 5 мВ при различных температурах.
2. Разработана методика получения стабильных гибридных частиц путем покрытия СаР-частиц 5 кДа хитозаном и гликоль-хитозаном со средним гидродинамическим диаметром 160 и 240 нм и ζ -потенциалом +12 и +20 мВ соответственно.
3. Предложены условия загрузки эналаприлата в СаР-частицы с эффективностью включения 40% и в гибридные частицы с эффективностью включения 66-72%.
4. Предложены условия загрузки СОД1 в гибридные частицы с эффективностью включения 64%, а также совместно СОД1 и эналаприлата с эффективностью включения 30% и 56%, соответственно.
5. Включение эналаприлата или СОД1 в гибридные частицы обеспечивало замедление высвобождения субстанций, увеличение времени удерживания в слезной жидкости и глубокое пролонгированное снижение ВГД *in vivo* у нормотензивных кроликов по сравнению с субстанциями в растворе и в СаР-частицах.
6. Обнаружено синергическое действие совместно включенных в гибридные частицы эналаприлата и СОД1 на снижение ВГД.
7. Получены частицы на основе 5 кДа хитозана и гликоль-хитозана, содержащие эналаприлат, с эффективностью включения эналаприлата 25% и 41%, соответственно. Показана большая эффективность гибридных частиц, содержащих эналаприлат, чем соответствующих хитозановых частиц, для снижения ВГД.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus

1. **Попова Е.В.**, Тихомирова В.Е., Безнос О.В., Чеснокова Н.Б., Григорьев Ю.В., Кост О.А. Хитозановые наночастицы – система доставки лекарств в офтальмологии // Вестник Московского Университета. Серия 2: Химия. 2023. Т. 64, №2, С. 30-40. (Импакт-фактор Scopus 0,521)
2. **Popova E.V.**, Matveeva O.D., Beznos O.V., Tikhomirova V.E., Kudryashova E.V., Grigoriev Y.V., Chesnokova N.B., Kost, O. A. Chitosan-Covered Calcium Phosphate Particles Co-Loaded with Superoxide Dismutase 1 and ACE Inhibitor: Development, Characterization and Effect on Intraocular Pressure // *Pharmaceutics*, 2023. Vol. 15, № 2. P. 550. (Импакт-фактор Scopus 6,525)
3. **Popova E. V.**, Tikhomirova V.E., Beznos O.V., Chesnokova N.B., Grigoriev Y.V., Klyachko N. L., Kost O.A. Chitosan-covered calcium phosphate particles as a drug vehicle for delivery to the eye // *Nanomedicine*, 2022. Vol. 40. P. 102493. (Импакт-фактор Scopus 6,458)

4. Vaneev A.N., Tikhomirova V.E., Chesnokova N.B., **Popova E.V.**, Beznos O.V., Kost O.A., Klyachko N. L. Nanotechnology for Topical Drug Delivery to the Anterior Segment of the Eye // Int J Mol Sci., 2021. Vol. 22, № 22. (Импакт-фактор Scopus 6,208)
5. Безнос О.В., **Попова Е.В.**, Тихомирова В.Е., Павленко Т.А., Кост О.А., Чеснокова Н.Б. Кальций-фосфатные наночастицы - система доставки лекарств в передний отдел глаза // Офтальмология. 2021. Т. 18, № 2. С. 331–337. (Импакт-фактор Scopus 0,32)

Тезисы докладов научных конференций

1. Kost O.A., Beznos O.V., Vinevski P.V., **Popova E.V.**, Tikhomirova V.E., Chesnokova N.B., Klyachko N.L. Inclusion of drugs into nano- and microparticles for use in ophthalmology // Biocatalysis-2019: Abstracts of 12th International Conference Biocatalysis: Fundamentals and Applications. — Moscow, 2019. — P. 88.
2. **Попова Е. В.** Покрытые хитозаном кальций-фосфатные частицы как носители для доставки лекарств в ткани глаза // Материалы международного конгресса Биотехнология: состояние и перспективы развития. — Т. 19. — ООО “ЭКСПО-БИОХИМ-ТЕХНОЛОГИИ” Москва, 2021. — С. 88–90.
3. **Порова Е. В.**, Tikhomirova V. E., Beznos O. V., Chesnokova N. B., Kost O.A. The enhancement of the efficiency of the intraocular pressure decrease by ACE inhibitor within chitosan-covered calcium phosphate particles // Book of abstracts of International Symposium on SupraBiomolecular Systems 2021. — France, 2021. — P. 54.
4. **Порова Е. В.**, Tikhomirova V.E., Beznos O.V., Chesnokova N.B., Kost O.A. Chitosan covered calcium phosphate particles as a vehicle for ocular drugs // Abstracts of Applied Nanotechnology and Nanoscience International Conference 2021. — France, 2021. — P. 155.
5. Безнос О. В., Чеснокова Н. Б., Кост О.А., **Попова Е.В.**, Тихомирова В.Е. Хитозан как перспективный компонент наночастиц, используемых в качестве носителей лекарственных веществ в офтальмологии // Сборник научных трудов. — Т. 2. — ФБГУ НМИЦ ГБ имени Гельмгольца Минздрава России Москва, 2022. — С. 374–377.

Список сокращений: **СаР-частицы** – кальций-фосфатные частицы; **PDI** – коэффициент полидисперсности; **АПФ** – ангиотензин-превращающий фермент; **ДСР** – динамическое светорассеяние; **ИК-Фурье спектроскопия** – инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье; **Модель БЭТ** – модель Брунауэра, Эммета и Теллера; **ПЭМ** – проникающая электронная микроскопия; **РФА** – рентгенофазовый анализ; **РЭМ** – растровая электронная микроскопия; **СОД1** – супероксиддисмутаза 1.