

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научные руководители:

к.х.н., в.н.с. Кост О.А.

к.х.н., н.с. Тихомирова В.Е.

МОСКВА – 2023

Оглавление

Список сокращений.....	5
Введение.....	6
1. Обзор литературы.....	11
1.1. Глаз и способы доставки препаратов.....	11
1.1.1. Строение глаза и его защитные барьеры.....	11
1.1.2. Некоторые заболевания глаз.....	13
1.1.3. Способы доставки лекарственных средств во внутренние области глаза.....	13
1.2. Фосфат кальция: характеристики и носители на его основе.....	15
1.2.1. Структурные типы фосфата кальция.....	15
1.2.2. Гидроксиапатит.....	18
1.2.3. Аморфный фосфат кальция.....	19
1.2.4. Трикальций фосфат.....	20
1.3. Кальций-фосфатные частицы.....	20
1.3.1. Получение СаР-частиц.....	20
1.3.2. Влияние условий получения на характеристики СаР-частиц.....	23
1.3.3. Области применения частиц на основе фосфата кальция.....	24
1.3.4. Цитотоксичность носителей на основе фосфата кальция и их метаболизм.....	28
1.4. Хитозан и его свойства.....	30
1.5. Хитозановые частицы и покрытые хитозаном частицы.....	33
1.5.1. Методы получения хитозановых частиц и покрытия частиц хитозаном.....	33
1.5.2. Применение хитозановых частиц и покрытых хитозаном в офтальмологии.....	35
1.6. Совместное применение хитозана и фосфата кальция.....	40
1.7. Ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АПФ).....	42
1.7.1. Механизм влияния компонентов РААС на развитие и лечение глазных заболеваний.....	43
1.7.2. Включение ингибиторов АПФ в носители.....	45
1.8. Супероксиддисмутаза.....	49
1.8.1. СОД в офтальмологии.....	50
1.8.2. СОД в составе носителей.....	51
2. Материалы и методы.....	56
2.1. Материалы.....	56
2.2. Методы получения и исследования частиц <i>in vitro</i>.....	57

2.2.1. Получение кальций-фосфатных частиц	57
2.2.2. Получение гибридных частиц	57
2.2.3. Получение хитозановых частиц	59
2.2.4. Определение гидродинамического диаметра и поверхностного заряда частиц..	59
2.2.5. Определение содержания хитозана в гибридных и в хитозановых частицах	60
2.2.6. Исследование морфологии частиц.....	60
2.2.7. Исследование фазового состава частиц	61
2.2.8. Определение площади поверхности частиц.....	61
2.2.9. Включение препаратов в СаР-частицы.....	62
2.2.10. Включение эналаприлата в хитозановые частицы.....	62
2.2.11. Оценка эффективности включения препаратов	62
2.2.12. Определение концентрации эналаприлата	63
2.2.13. Определение активности СОД1	64
2.2.14. Кинетика высвобождения препаратов из частиц	65
2.2.15. Изучение стабильности частиц	66
2.2.16. Исследование стабильности СОД1	66
2.2.17. Оценка влияния эналаприлата на активность СОД1 и СОД1 на ингибирующую активность эналаприлата	67
2.2.18. ИК-Фурье спектроскопия образцов СаР-частиц	67
2.3. Исследование частиц с эналаприлатом и СОД1, в экспериментах <i>in vivo</i>	68
2.3.1. Изучение влияния включения эналаприлата и СОД1 в частицы на удержание препарата в слезной жидкости	68
2.3.2. Изучение влияния препаратов в растворе и в частицах на ВГД.....	69
2.3.2. Влияние СаР-частиц с эналаприлатом на восстановление увеального кровотока при ишемии глаза.....	70
3. Результаты и обсуждение	71
3.1. Подбор условий получения пустых СаР-частиц.....	71
3.1.3. Совместное влияние концентрации цитрата натрия и рН на характеристики частиц, полученных при охлаждении	74
3.1.4. Влияние мощности ультразвукового воздействия на характеристики СаР- частиц	75
3.1.5. Влияние времени обработки ультразвуком на характеристики частиц	76
3.1.6. Зависимость характеристик СаР-частиц от диаметра емкости и времени при обработке ультразвуком	77
3.2. Характеристики пустых СаР-частиц	78
3.2.1. Фазовый состав СаР-частиц	78

3.2.2. Морфология СаР-частиц	79
3.2.3. Определение площади поверхности СаР-частиц	80
3.3. Подбор условий покрытия СаР-частиц хитозанами двух видов	81
3.3.1. Используемые в работе виды хитозана	81
3.3.2. Подбор рН системы при покрытии	83
3.3.3. Подбор соотношения ТПФ:хитозан	87
3.4. Характеристики СаР-частиц, покрытых хитозаном	89
3.4.1. Фазовый состав покрытых хитозанами СаР-частиц	90
3.4.2. Морфология покрытых хитозанами СаР-частиц	91
3.4.3. Эффективность покрытия СаР-частиц хитозанами	93
3.4.4. Изучение взаимодействия СаР-частиц и 5 кДа хитозана методом ИК-спектрологии.....	94
3.4.5. Стабильность СаР-частиц при хранении	95
3.5. Включение препаратов в СаР-частицы, покрытые хитозанами.....	101
3.5.1. СаР-частицы с включенным эналаприлатом	103
3.5.2. СаР-частицы с включенной супероксиддисмутазой 1	117
3.5.3. СаР-частицы с совместно включенными СОД1 и эналаприлатом.....	125
3.6. Хитозановые частицы, содержащие эналаприлат.....	134
Заключение.....	146
4. Выводы.....	147
Список литературы	148

Список сокращений

- CaP-частицы – кальций-фосфатные частицы
- Hepes – N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N-(2-этансульфоновая кислота)
- His-Leu – гистидил-лейцин
- PDI – коэффициент полидисперсности
- ZPHL – N-карбобензоксид-L-фенилаланил-L-гистидил-L-лейцин
- АПФ – ангиотензин-превращающий фермент
- АФК – активные формы кислорода
- Буфер А – 0,05M Hepes буфер, pH 7,5, содержащий 0,15M NaCl и 1 мкM ZnCl₂
- ВГД – внутриглазное давление
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ДСР – динамическое светорассеяние
- ИК-Фурье спектроскопия – инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье
- миРНК – малые интерферирующие РНК
- Модель ВЖН – модель Баррета–Джойнера–Халенда
- Модель БЭТ – модель Брунауэра, Эммета и Теллера
- ПЛГА – поли(D,L-лактид-ко-гликолид)
- ПММА – полиметилметакрилат
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- ПЭМ – проникающая электронная микроскопия
- РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система
- РФА – рентгенофазовый анализ
- РЭМ – растровая электронная микроскопия
- СОД – супероксиддисмутаза
- ТЕМЕД – тетраметилэтилендиамин
- ТПФ – триполифосфат натрия
- ЭДТА – этилендиаминтетраацетат натрия

Введение

Актуальность работы. По данным Всемирной организации здравоохранения, около 300 миллионов человек во всем мире живут с серьезными нарушениями зрения [1]. 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 [2]. Однако во внутренние ткани глаза попадает не более 5% от общей вводимой таким образом дозы из-за наличия барьера роговицы и смыва слезной жидкостью [2]. 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 [3,4].

Среди различных носителей большой интерес представляют неорганические кальций-фосфатные частицы (СаР-частицы) благодаря их биосовместимости, биodeградируемости, контролируемому получению [5]. Материалы на основе фосфата кальция широко используются в тканевой инженерии и для доставки лекарств [5]. Возможно включение в носители на основе фосфата кальция как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных веществ [6–8].

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 [9]. Эти свойства делают хитозан перспективным материалом для различных областей применения [10,11], в частности, для покрытия СаР-наночастиц, которые можно было бы использовать для доставки лекарственных средств в глаз [12].

Патогенез множества заболеваний глаза связан с ишемией, воспалением, повышенным внутриглазным давлением (ВГД) и окислительным стрессом [13–16]. Одной из систем организма,

регулирующей эти процессы, является ренин-ангиотензин-альдостероновая система, основным ферментом которой является ангиотензин-превращающий фермент (АПФ) [17–19]. АПФ принимает участие в развитии заболеваний, связанных с изменением ВГД [20,21], воспалением и ишемией тканей глаза [22–26]. Имеются сведения о терапевтическом действии ингибиторов АПФ при дистрофии сетчатки глаза [27], диабетической ретинопатии [28], ожоговой болезни глаз [24] и глаукоме [29] за счет снижения концентрации ангиотензина II – продукта реакции гидролиза ангиотензина I посредством АПФ [30].

С другой стороны, снижения окислительного стресса, сопровождающего многие заболевания глаз, можно добиться путем использования антиоксидантных ферментов, например, супероксиддисмутазы 1 [31]. 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 [32]. Показана эффективность местного применения СОД1 для лечения окислительного стресса и воспалительных процессов в глазу [33,34].

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 целлобиозой, 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, контролируемыми 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 рН среды синтеза, а также концентрацию стабилизирующего агента, можно формировать стабильные СаР-частицы с узким распределением по гидродинамическому диаметру и различной морфологией;
- 2) Покрытие СаР-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 СаР-частиц использовали метод соосаждения с одновременной ультразвуковой обработкой суспензии. Для характеристики частиц были задействованы современные методы анализа: растровая электронная микроскопия (РЕМ), 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.

1. Обзор литературы

1.1. Глаз и способы доставки препаратов

1.1.1. Строение глаза и его защитные барьеры

Глаз – один из самых сложных органов чувств человеческого тела, который отвечает за зрение [35]. Анатомически глаз можно разделить на передний и задний сегмент, вмещающие одну треть и две трети глазного объема соответственно. Передний сегмент состоит из слезной пленки, роговицы, конъюнктивы, передней и задней камеры, радужной оболочки, цилиарного тела, хрусталика и водянистой влаги, а задний сегмент включает склеру, сосудистую оболочку, сетчатку, мембрану Бруха, стекловидное тело, зрительный нерв и кровеносные сосуды сетчатки (Рис. 1) [35].

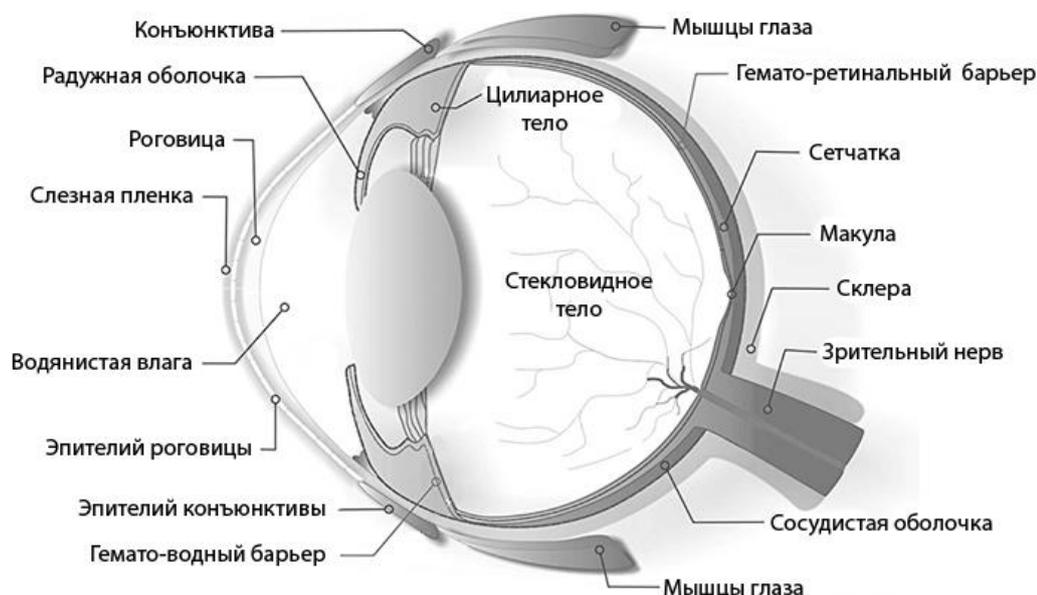


Рис. 1. Анатомия глаза [35].

Первым защитным барьером глаза является слезная пленка. Она состоит из трех слоев: липидного, водного и муцинового, общей толщиной около 3 мкм [35]. Наружный липидный слой состоит из свободных жирных кислот, триглицеридов, фосфолипидов и т.д. и предотвращает испарение слезной жидкости. Средний водный слой увлажняет и смазывает поверхность глаза, смывает посторонние частицы и помогает защитить от инфекции. Он содержит 120-170 мМ NaCl, гидрокарбоната, катионов калия, кальция, муцина, иммуноглобулинов, альбумина, а также антибактериальных компонентов лизоцима и бетализина [36]. Муциновый слой представляет собой секрет многослойных плоских эпителиальных клеток роговицы и конъюнктивы и бокаловидных клеток конъюнктивы. Он помогает водному слою контактировать с поверхностью глаза, обеспечивает питание роговицы и защищает от внешних воздействий [35]. Муцины представляют собой гликопротеины, содержащие кислые полисахариды. В состав

полисахаридной части входят сиаловые кислоты, из них наиболее часто встречается N-ацетилнейраминавая кислота. Обилие этих кислот в муциновом слое обеспечивает общий отрицательный заряд поверхности глаза.

Слезная пленка является наиболее заметным барьером, затрудняющим достижение необходимой терапевтической концентрации при местном применении лекарственного средства. Причиной этого является разведение слезы за счет непрерывного обмена (приблизительно 1 мкл/мин) и связывания лекарственного средства с белками [37]. Обычно объем одной глазной капли составляет 20–50 мкл, в то время как на поверхности глаза может удерживаться только 7–10 мкл жидкости, что приводит к потере лекарственного средства [38].

Следующий слой – роговица – прозрачная бессосудистая часть человеческого глаза, играющая жизненно важную роль в формировании зрения. Роговица состоит из 5 слоев: эпителия, мембраны Боумена, стромы, десцеметового слоя и эндотелия [35]. Эпителий роговицы создает барьер для большинства гидрофильных лекарств, в то время как микроворсинки на поверхности обеспечивают большую площадь поверхности для абсорбции лекарств. Эти клетки расположены очень плотно, что не позволяет гидрофильным лекарственным средствам проходить между ними. При этом другой слой – строма, составляющая 90% массы роговицы и состоящая из воды, коллагена, гликопротеидов и кератоцитов, является барьером для липофильных молекул [35].

Конъюнктивa – тонкая мембрана, которая выстилает внутреннюю часть века и покрывает склеру. Конъюнктивa состоит из некератинизированного многослойного эпителия и бокаловидных клеток и сильно васкуляризована.

Передняя камера находится между конъюнктивой и радужной оболочкой, а задняя камера – между радужкой и цилиарным телом. Они обе наполнены водянистой влагой – прозрачной жидкостью, которая схожа по составу с плазмой крови, однако с более низкой концентрацией белков. Эпителий цилиарного тела и радужки, а также кровеносные сосуды, питающие радужку, вместе образуют гематоводный барьер – один из основных барьеров для проникновения лекарств внутрь глаза. При этом постоянный ток водянистой влаги приводит к быстрому удалению лекарственного средства [35].

Сетчатка – самая внутренняя, васкуляризованная и иннервированная часть глаза, в ней формируется изображение. Венозный ток сетчатки является основным путем элиминирования лекарства из нее. Эпителиальные клетки и эндотелий кровеносных сосудов сетчатки образуют гематоретинальный барьер – огромное препятствие для доставки лекарств в сетчатку [35].

Таким образом, ввиду важнейших функций глаза, он имеет множество защитных барьеров, как покрывающих поверхность (слезная пленка, роговица, конъюнктивa), так и сосудистых (гематоводный и гематоретинальный барьеры).

1.1.2. Некоторые заболевания глаз

Среди необратимых причин снижения зрения в мире лидирует возрастная макулярная дегенерация (200 млн), глаукома (60 млн) и диабетическая ретинопатия (3 млн) [16].

Возрастная макулярная дегенерация сетчатки – прогрессирующее глазное заболевание, которое приводит к снижению остроты зрения за счет поражения центрального отдела сетчатки глаза [15]. Развитие этого заболевания может быть связано с окислительным стрессом, воспалением, образованием отложений в макуле, истончением хориокапилляров, утолщением мембраны Бруха и ишемией сетчатки [15]

Глаукома является основной причиной необратимой слепоты в мире. Это группа состояний, характеризующихся прогрессирующим повреждением зрительного нерва, сопровождающиеся потерей зрения. Появляется все больше данных о том, что патогенез глаукомы зависит от взаимодействия нескольких механизмов, включая внутриглазное давление (ВГД), гипоксию, окислительный стресс, участие аутоиммунных процессов и т.д. [14,39]. Среди них ВГД, которое определяется балансом между секрецией водянистой влаги и ее дренированием, является основным фактором [14].

Диабетическая ретинопатия является основным осложнением сахарного диабета [16]. Ее возникновение связано с длительным эпизодом гипергликемии (повышенной концентрации глюкозы в крови), которая индуцирует окислительный стресс [16,40]. Происходящие биохимические нарушения приводят к ишемии сетчатки, что запускает процесс неоваскуляризации, избыточной продукции эндотелиального фактора роста сосудов и устойчивому снижению плотности капилляров сетчатки [16,28,40,41].

Также широкое распространение имеют заболевания катаракта и увеит. Катаракта – заболевание, связанное с помутнением хрусталика. Одним из пусковых механизмов катарактогенеза считается истощение антиокислительного потенциала хрусталика и развитие окислительного стресса [16]. Увеит - воспаление сосудистой оболочки глаза, вызванное повреждением целостности оболочек глаза или включением патологического агента. При увеите имеется высокая степень корреляции между выраженностью воспаления и окислительным стрессом [13].

1.1.3. Способы доставки лекарственных средств во внутренние области глаза

Как мы уже упоминали во введении, глазные патологии чаще всего лечат путем местного закапывания лекарственных средств в форме растворов вследствие простоты их получения и возможности использования самими пациентами. Эффективность лечения глазными каплями и мазями невысока из-за наличия глазных барьеров и оттока слезы. Обеспечить увеличенное время нахождения препарата в глазу, его медленное высвобождение и сокращение частоты введения

могут инвазивные способы доставки лекарственного препарата к внутриглазным тканям, например, инъекция препаратов в стекловидное тело или имплантация в него устройства, поддерживающего постоянное выделение лекарственного средства. Однако необходимость своевременной замены имплантатов, а также риск плохой переносимости пациентами уколов в глаз и развития осложнений, например, катаракты значительно ограничивает их применение [42].

Для более безопасного увеличения эффективности проникновения препарата можно использовать дисперсные системы, содержащие микро- и наноразмерные носители лекарственных средств, как, например, дендримеры, липосомы, наномицеллы, гидрогели и частицы различной природы (полимерные, неорганические) [3].

Потенциал для неинвазивного введения лекарственных препаратов имеют системы, содержащие наночастицы. Они могут обеспечить одновременно повышение проницаемости лекарственного средства через гематоводный барьер и роговицу, продление времени контакта препарата с тканями глаза, доставку лекарств к определенному участку ткани контролируемым образом, защиту лекарств от метаболизма и их замедленное высвобождение [3,43].

Такие наноносители можно получать из различных как органических, так и неорганических материалов, контролируя любые их характеристики [3,5,12]. В качестве основы полимерных наночастиц обычно используют следующие полимеры: поли(D,L-лактид-со-гликолид) (ПЛГА); поли(ϵ -капролактон); полиакриламид; полицианоакрилат; полиметилметакрилат; а также природные полимеры, например, хитозан, желатин, альгинат натрия и альбумин [44–50]. Из липидов можно получать липосомы и липидные наночастицы [51]. Неорганические наночастицы представлены наночастицами золота и серебра, диоксида церия, кремнезема, а также неорганическими солями, такими как фосфат и карбонат кальция [3,52]. Полимерные носители хороши в качестве носителей для высокомолекулярных веществ, в то время как низкомолекулярные вещества могут быть включены в липосомы, хитозановые и неорганические частицы, например, в частицы на основе фосфата кальция, карбоната кальция. Более того, частицы на основе солей можно включить и низкомолекулярные, и высокомолекулярные соединения [7,53–56].

Эффективность взаимодействия частиц с поверхностью глаза определяется их характеристиками, в частности, размером и поверхностным зарядом [57]. Для местных инстилляций предпочтительно использование наночастиц со средним диаметром от 50 до 500 нм [58,59]. Такой размер позволяет носителям преодолевать глазные физиологические барьеры и проникать в муциновый слой глаза [59]. Помимо этого, небольшой размер частиц и низкий индекс их полидисперсности обеспечивает возможность их поглощения клетками роговицы [60].

Также на взаимодействие частиц с роговицей влияет их поверхностный заряд: муциновый слой на поверхности глаза имеет отрицательный заряд, таким образом, более высокое сродство

к глазу имеют частицы, обладающие положительным ζ -потенциалом [58]. Придать частицам положительный заряд поверхности можно с помощью их покрытия катионными полимерами, например хитозаном. Было показано, что покрытие частиц хитозаном приводило к увеличению их взаимодействия с различными тканями глаза (конъюнктиве, склере, сосудистой оболочке и сетчатке) [61]. Более того, хитозан может открывать плотные контакты эпителиальных клеток, тем самым способствуя проникновению частиц сквозь барьер роговицы [58,61].

Ниже мы остановимся более подробно на характеристиках кальций-фосфатных частиц.

1.2. Фосфат кальция: характеристики и носители на его основе

Фосфат кальция – неорганическое соединение кальция и кислородосодержащих фосфорных кислот [62]. В природе встречается в виде пород магматического (апатиты) и осадочного (фосфориты) происхождения [63].

В биологических объектах также синтезируется фосфат кальция [63]. Считается, что образование преципитатов фосфата кальция в одноклеточных организмах обеспечивает хранение и регулирование содержания основных элементов, таких как кальций, фосфор и, возможно, магний [64]. У позвоночных фосфаты кальция встречаются в качестве основного неорганического компонента нормальных (кости, зубы, рога и некоторые виды панцирей) и патологических (зубные и почечные камни, атеросклеротические поражения и т. д.) кальцификаций. В частности, у человека все твердые ткани тела образованы фосфатом кальция [63]. Ввиду структурной схожести фосфата кальция из живых организмов с гидроксиапатитом, его называют «биологическим апатитом».

Поскольку фосфат кальция входит в состав человеческого организма, он является перспективным материалом для использования в медицине [5,62]. В частности, его используют в качестве пломбирочных материалов в челюстно-лицевой хирургии, офтальмологии, нейрохирургии, в качестве имплантатов и биопокрытий эндопротезов [65]. К преимуществам фосфатов относятся остеоиндуктивные и остеокондуктивные свойства, которые также важны для регенерации кости [65].

Благодаря биосовместимости, биodeградируемости, контролируемым свойствам фосфат кальция может применяться в виде нано- и микрочастиц в качестве носителя лекарственных средств [7,8,53–55,66–68].

1.2.1. Структурные типы фосфата кальция

Все известные фосфаты кальция можно разделить на три основных структурных типа:

- 1) Тип апатита: гидроксиапатит, фторапатит, оксиапатит, кальций-дефицитный гидроксиапатит, октакальцийфосфат, тетракальцийфосфат.

- 2) Тип гласерита: α -трикальцийфосфат, β -трикальцийфосфат и аморфный фосфат кальция
- 3) Остальные фосфаты кальция: монокальцийфосфат моногидрат, монокальцийфосфат безводный, дикальцийфосфат дигидрат, дикальцийфосфат безводный [69].

Поскольку на характеристики частиц может влиять положение атомов внутри них, очень важно знать периодическое расположение атомов или, другими словами, кристалличность. Различная степень кристалличности может привести к изменению морфологии кальций-фосфатных частиц (CaP-частиц). Одним из основных методов установления фазового состава является рентгенофазовый анализ (РФА). РФА основан на дифракции рентгеновских лучей на кристаллической решетке анализируемого вещества. На рис. 2 представлены дифрактограммы некоторых фаз фосфата кальция.

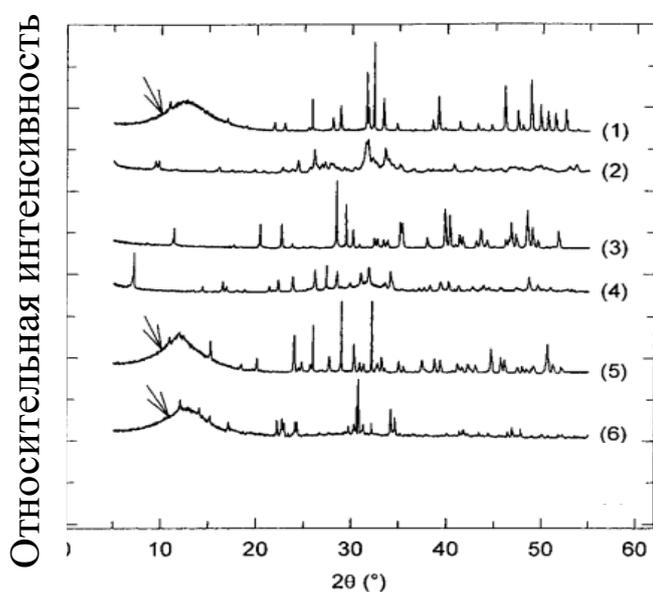


Рис. 2. Дифрактограммы различных фаз фосфата кальция: (1) гидроксиапатит, (2) октакальций фосфат, (3) дикальцийфосфат дигидрат, (4) аморфный фосфат кальция, (5) α -трикальцийфосфат, (6) β -трикальцийфосфат [70].

Наиболее важными параметрами, характеризующими разные фазы фосфата кальция, являются соотношение кальция и фосфора Ca/P, основность/кислотность и растворимость [63]. Чем ниже молярное соотношение Ca/P в соответствующей фазе, тем выше её кислотность и растворимость в воде [69]. Именно поэтому соотношение Ca/P может рассматриваться как «отпечаток» фазы фосфата кальция. Проанализировав табл. 1, можно заметить, что растворимость изменяется от высоких значений для кислых фосфатов до очень низких значений для основных апатитов [69]. Поскольку в растворах фосфатов существуют равновесия между различными формами фосфат-иона, то изменение pH раствора влечёт за собой изменение концентраций всех четырёх форм фосфорной кислоты, что влияет на химический состав и количество фосфата кальция, получаемого из раствора при осаждении [63].

Табл. 1. Основные фазы фосфата кальция [69]

Соотношение Ca/P	Вещество	Формула	Растворимость при 25 °С, lgK _s	Условия получения из растворов
0.5	Монокальцийфосфат моногидрат	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,14	pH<2
0.5	Монокальцийфосфат безводный	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	1,14	pH<2, t°>100°С
1.0	Дикальцийфосфат дигидрат (брушит)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6,59	2,0<pH<6,5
1.0	Дикальцийфосфат безводный (монетит)	CaHPO_4	6,90	2,0<pH<6,5, t°>100°С
1.33	Октакальцийфосфат	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	96,6	5,5<pH<7,0
1.5	α-Трикальцийфосфат	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	25,5	-
1.5	β-Трикальцийфосфат	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	28,9	-
1.0–2.2	Аморфный фосфат кальция	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z n\text{H}_2\text{O}$, n = 3–4.5; 15–20% H ₂ O	Невозможно измерить	5<pH<12
1.5–1.67	Кальцийдефицитный гидроксиапатит	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ (0 < x < 1)	85,1	6,5<pH<9,5
1.67	Гидроксиапатит	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	116,8	9,5<pH<12
1.67	Фторапатит	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	120,0	7<pH<12

Далее подробно будут рассмотрены фазы фосфата кальция, наиболее часто применяемые в медицине.

1.2.2. Гидроксиапатит

Носители лекарственных средств на основе фосфата кальция чаще всего представляют собой гидроксиапатит [5,71–74]. Гидроксиапатит – один из основных фосфатов кальция – является наиболее стабильным и наименее растворимым из них.

В зависимости от условий синтеза гидроксиапатит может иметь различную форму: стержнеобразную [75–78] или сферическую [72,75,79] (Рис. 3).

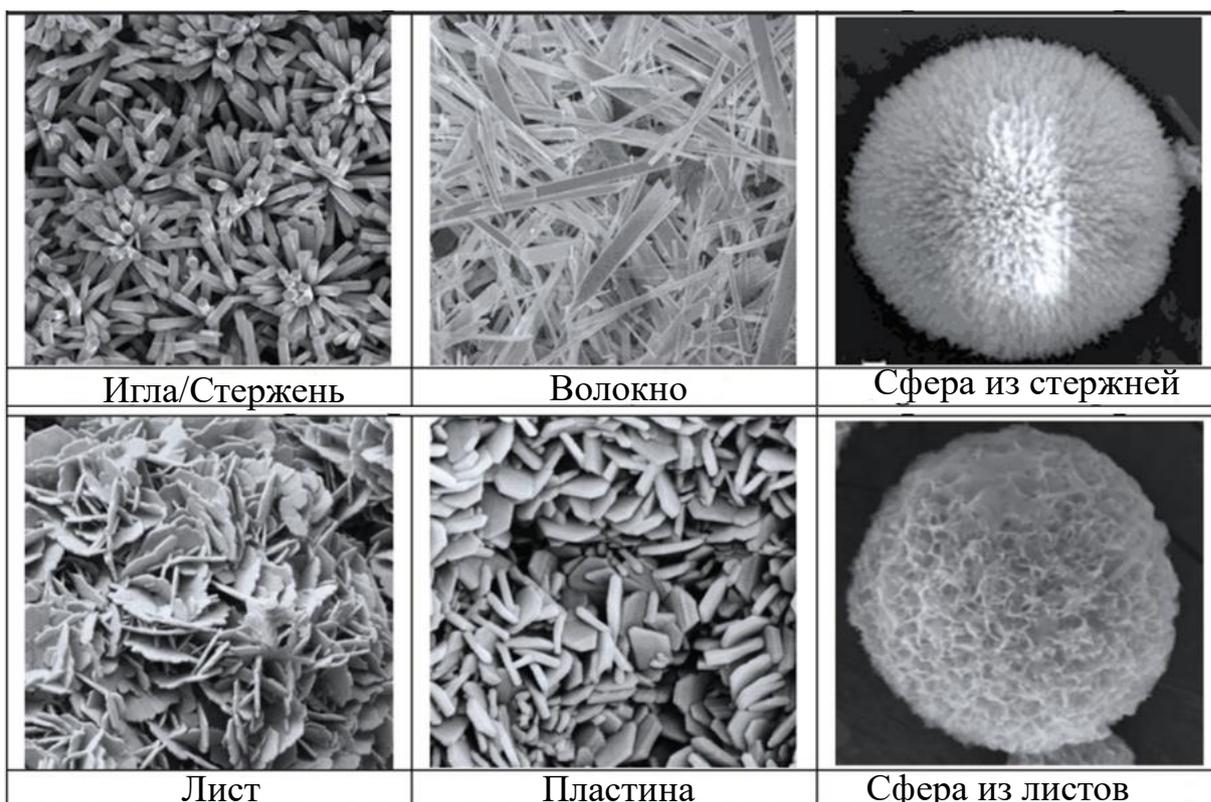
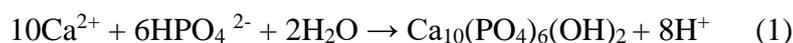


Рис. 3. Типичная морфология наноструктурированного гидроксиапатита [80].

Наиболее удобным методом получения любой фазы фосфата кальция является осаждение из водных растворов соответствующих солей фосфата и кальция. При этом для получения гидроксиапатита необходимо соблюдение нескольких условий: соотношение $Ca/P=1,67$ [69], высокие значения pH (10-11) и температуры [81].

Суммарное уравнение получения гидроксиапатита приведено ниже:



Процесс образования гидроксиапатита в реакции осаждения из раствора можно разделить на следующие стадии: 1) гомогенное зародышеобразование; 2) образование сферических частиц аморфного фосфата кальция; 3) агрегирование сфер в цепочечные структуры; 4) рост этих структур; 5) вторичное осаждение и фазовое превращение в

гидроксиапатит [82]. Во время образования гидроксиапатита происходят следующие фазовые превращения фосфата кальция: при $\text{pH} < 6,7$ октакальцийфосфат превращается в дикальцийфосфат дигидрат, который переходит в гидроксиапатит, а при $\text{pH} > 6,7$ дикальцийфосфат дигидрат перекристаллизовывается в октакальцийфосфат, а затем - в гидроксиапатит. Этот процесс чувствителен к температуре: для получения гидроксиапатита при 25°C требовалось 24 часа, тогда как тот же процесс завершился всего за 5 минут при 60°C . Когда осаждение проводили при 95°C , образование гидроксиапатита было настолько быстрым, что все другие фазы практически не определялись [82].

Также на осаждение гидроксиапатита из раствора влияет pH , поскольку сдвиг в сторону более низкого pH смещает баланс фосфатных форм с PO_4^{3-} на HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- и H_3PO_4 . Следовательно, чем ниже pH , тем больше фосфатных групп будет протонировано, таким образом, тем менее эффективно будет происходить осаждение. Кроме того, изменение pH среды может изменять поверхностный заряд взаимодействующих частиц, изменяя распределение протонов и гидроксильных групп на поверхности раздела фаз [83].

Таким образом, с помощью условий синтеза: соотношения реагентов, температуры, способа синтеза и pH можно регулировать фазовый состав образующегося гидроксиапатита.

1.2.3. Аморфный фосфат кальция

Аморфный фосфат кальция представляет собой фазу, не имеющую дальнего порядка расположения атомов в кристаллической решетке [64]. Эта фаза является начальной при осаждении фосфатов кальция, которая затем перекристаллизовывается в более стабильные фазы (гидроксиапатит, октакальций фосфат и т.д.) [64,82].

Наиболее удобным способом получения аморфного фосфата кальция является его осаждение из растворов [64,84–86]. Степень его аморфности повышается с увеличением концентрации растворов, содержащих Ca^{2+} и PO_4^{3-} , а также при повышении значения pH раствора и низкой температуре кристаллизации [63]. Получаемый таким образом аморфный фосфат кальция состоит из частиц сферической формы размером 20-120 нм. Однако он является метастабильной фазой и, как было ранее упомянуто, с течением времени переходит в более стабильное состояние [64]. Присутствие полиэтиленгликоля, пирофосфат-анионов, карбоната или магния в растворе при кристаллизации способствует образованию аморфного фосфата кальция и замедляет его дальнейшую трансформацию, а присутствие фтора оказывает противоположное действие [64,87].

В качестве другого способа получения аморфного фосфата кальция применяют синтетические методы в органических растворителях [64,88]. Органические растворители,

например, спирты, способствуют его образованию, поскольку их диэлектрическая проницаемость ниже, чем у воды. Вследствие этого происходит снижение растворимости и увеличение пересыщения, ионы в растворе становятся менее сольватированными, что способствует аморфизации [88].

Метастабильность аморфного фосфата кальция является ограничивающим фактором для его использования.

1.2.4. Трикальций фосфат

Трикальций фосфат представлен в виде двух полиморфных модификаций – α и β [62,69]. Это высокотемпературные фазы, которые получают при температурах выше 800°C (β) или 1200°C (α) путем твердофазного синтеза, например, спеканием карбоната кальция с фосфатом [69]. При этом необходимо поддерживать соотношение $\text{Ca:P}=1:1,5$ [63,69]. Помимо химического получения, ионзамещенный β -трикальций фосфат может быть получен кальцинированием костей, такую фазу иногда называют «костной золой» [89].

α -трикальций фосфат не встречается в биологических кальцификациях. Основным недостатком использования чистого α -трикальций фосфата является его быстрая скорость резорбции, превышающая скорость образования новой кости, что ограничивает его использование в биомедицинских целях [62]. В сочетании с гидроксипатитом β -трикальций фосфат используется в качестве костозамещающей биокерамики.

1.3. Кальций-фосфатные частицы

Рассмотренные выше фазы фосфата кальция имеют широкое применение в медицине. При этом, фосфаты кальция можно получать с контролируемым размером: от нано- до макромасштаба; и разнообразными формами [5,52,89].

1.3.1. Получение CaP-частиц

В литературе описано множество различных способов получения CaP-частиц с различной морфологией и размерами (Табл. 2). Как правило, частицы фосфата кальция получают различными методами: осаждение из растворов [8,84,90–92], микроэмульсионный синтез [93–96], пиролиз в пламенном распылении [97], твердофазный синтез [98,99] и ферментативное получение с помощью щелочной фосфатазы [78,100,101].

Табл.2. Методы получения СаР-частиц

Метод	Преимущества	Ограничения	Ссылки
Осаждение из растворов	Возможность контролировать кристалличность и размер частиц путем изменения рН, концентрации, температуры и времени осаждения; возможность использовать органические и биоорганические вещества	Если проводить синтез быстро при низкой температуре – получается слабокристаллический осадок	[8,53,84,90–92]
Мироэмульсионный синтез	Возможность контролировать размер и морфологию частиц	Требуются органические растворители	[93–95]
Пиролиз в пламенном распылении	Высокая кристалличность	Невозможность использовать органические вещества, дорогое оборудование	[97]
Твердофазный синтез	Простота и низкая стоимость; хорошо закристаллизованные частицы	Агломерированные частицы; плохая редиспергируемость; невозможно применение органических соединений	[98,99]
Ферментативный синтез	Возможность включения органических веществ, контролируемая морфология	Нужно соблюдать условия для активности щелочной фосфатазы	[78,100,101]

Осаждение из раствора

Наиболее простой методикой получения СаР-частиц является осаждение из водных растворов. Осаждение из воды является простым, экономичным и безопасным, так как не требуется органический растворитель. Например, существует следующая методика получения СаР-частиц: водные растворы солей кальция и гидрофосфата натрия (калия, аммония) смешивают в эквимольных концентрациях с использованием цитрата натрия как

стабилизирующего агента, затем их подвергают ультразвуковому воздействию с предварительным выдерживанием в растворе при перемешивании в течение 2 суток [102], однако было показано, что выдерживание является необязательным [53]. Цитрат кальция образует заряженный слой вокруг частиц, способствуя повышению их устойчивости к агрегации за счет электростатического отталкивания [103]. Как было определено методом динамического светорассеяния, в таких условиях образуются частицы с размерами от 10 до 3000 нм [103]. Данная методика широко применяется для получения СаР-частиц в качестве носителей лекарственных средств [7,53–55,66,73].

Существует гидротермальный метод синтеза СаР-частиц: для получения пористых сферических наночастиц смешивали динатриевую соль аденозин-5-трифосфата (АТФ) в качестве источника фосфора и стабилизатора частиц с раствором хлорида кальция и дальнейшей обработкой микроволновым излучением [91,104]. В данных условиях молекулы АТФ гидролизуются с выделением фосфат-ионов, которые реагируют с ионами кальция, образуя частицы фосфата кальция сферической формы [84].

Микроэмульсионный синтез

Золь-гель синтез основан на реакции источника кальция и источника фосфата, обычно в органическом растворителе [93–95]. В литературе, например, описан микроэмульсионный метод получения СаР-частиц в системе вода/гексан/полиоксиэтилен-(5)-нонилфениловый эфир [95,105]. Зарождение и рост СаР-частиц могут происходить только до размера менее 30 нм, ограниченного размером мицелл, образованных поверхностно-активным веществом. Однако конечный продукт может сильно различаться в зависимости от соотношения кальция и фосфата, молярного соотношения воды и поверхностно-активного вещества [106].

Пиролиз в пламенном распылении

В этом методе раствор или дисперсия источников фосфата и кальция впрыскивается в пламя, где образование частиц происходит при высокой температуре [97]. Используемые растворители, источники ионов, температура и время пребывания в пламени — все это влияет на реакцию горения, обеспечивая контроль над размером частиц и фазовым составом, но часто наблюдается необратимая агломерация частиц. Для синтеза требуется дорогостоящее оборудование, однако такой метод подходит для широкомасштабного синтеза как СаР-частиц, так и покрытия фосфатом кальция имплантатов [97]. Метод непригоден, однако, для включения органических или биологических соединений.

Ферментативный синтез

Щелочная фосфатаза – фермент, дефосфорилирующий ряд биологически активных соединений, а также способный гидролизовать эфиры фосфорной кислоты при основных

значениях pH [107]. В качестве источника фосфора при синтезе СаР-частиц чаще всего применяется глицерофосфат [78,100,101,107]. Использование щелочной фосфатазы позволяет осаждать чистый гидроксиапатит [101,107]. На фазовый состав может влиять значение pH, количество фермента, концентрация Ca^{2+} и температура [101]. Недостатком метода может служить необходимость поддерживать оптимальные условия каталитической активности фермента.

1.3.2. Влияние условий получения на характеристики СаР-частиц

При синтезе частиц описанными выше методами возможно варьирование большого числа параметров, которые могут влиять на характеристики получаемых СаР-частиц.

Прежде всего, на характеристики СаР-частиц может влиять соотношение Са:Р. Как видно из табл. 1, соотношение Са:Р в первую очередь влияет на фазовый состав образующихся частиц. Были исследованы параметры СаР-частиц с липидным покрытием, полученные микроэмульсионным методом в системе вода/гексан/полиоксиэтилен-(5)-нонилфениловый эфир при соотношении Са:Р от 25 до 400 [105]. Оказалось, что при увеличении соотношения Са:Р с 25 до 100 размер частиц уменьшался со 100 до 20 нм, а при дальнейшем увеличении до 400 размер практически не менялся (Рис. 4). В то же время ζ -потенциал понижался от -7,5 мВ до -15 мВ, а индекс полидисперсности частиц увеличивался [105].

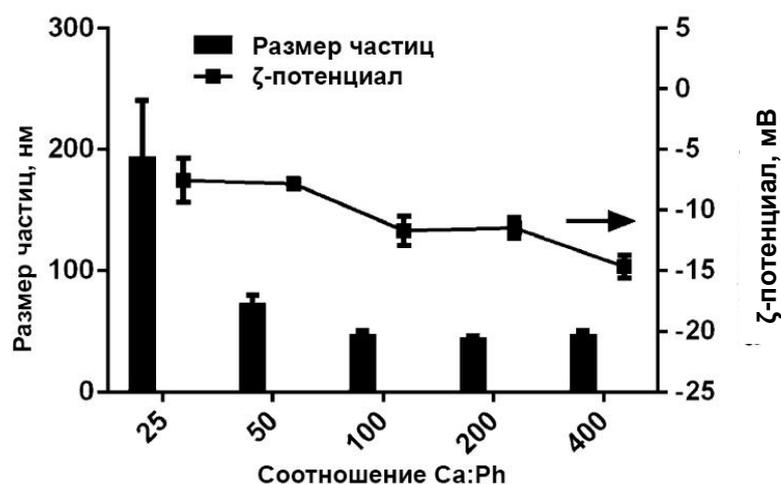


Рис. 4. Средний размер и ζ -потенциал частиц, полученных при различных соотношениях Са:Р [105].

Даже при постоянном соотношении Са:Р на характеристики частиц может влиять концентрация солей при соосаждении: увеличение концентрации солей фосфата и кальция приводит к увеличению частиц в размере, а также дестабилизации системы и выпадению осадка [55]. Также на характеристики частиц влияет концентрация цитрат-аниона,

служащего стабилизирующим агентом. При концентрации цитрата натрия 0,05-0,15 М водные дисперсии СаР-частиц были устойчивы к седиментации в течение длительного времени. Повышение концентрации стабилизатора от 0,05 до 0,20-0,30 М приводило к снижению ζ -потенциала от -28 мВ до -7 мВ и образованию крупных агрегатов [71].

На характеристики осаждаемых СаР-частиц могут влиять параметры системы – значение рН и температура синтеза. Проведение синтеза при температуре 4°C способствовало образованию частиц с гидродинамическим радиусом 40-100 нм с пористой структурой и высокой степенью кристалличности, а при высоких температурах (40°C) формировались аморфные частицы с гидродинамическим радиусом 60–230 нм. Снижение значения рН среды с 7,5 до 5,8 приводило к появлению частиц большого размера со средним гидродинамическим радиусом около 400 нм. Замена потенциалопределяющих ионов Na⁺ на K⁺ привела к более высокому абсолютному значению ζ -потенциала (-15 мВ по сравнению с -6 мВ) [53].

1.3.3. Области применения частиц на основе фосфата кальция

Тканевая инженерия

Одной из наиболее широких областей применения фосфата кальция является тканевая инженерия [65,108]. Кальций-фосфатные композиты используются в стоматологии и хирургии ввиду их химического сходства с содержащими фосфат кальция тканями млекопитающих и, следовательно, превосходной биосовместимостью [65,108]. Например, фосфат кальция может использоваться для реминерализации зубов [109], заполнения кариозной полости при лечении кариеса и при восстановлении зубов [110]. Следующим шагом в получении материалов для замещения кости стала разработка каркасов тканевой инженерии, которые позволяли включить и активировать клетки в их структурах: благодаря улучшению спекаемости, увеличению плотности и лучшей биологической активности по сравнению с кристаллами, они могут использоваться в качестве основных компонентов самостоятельной настройки костных цементов [65,108].

Доставка противораковых препаратов

Ряд работ посвящен системам доставки на основе СаР-частиц с включенными в них противоопухолевыми лекарственными средствами [95,104,111]. Большинство противораковых препаратов по своей природе гидрофобны, поэтому их введение в ткани возможно, в частности, в спиртовом растворе, что сопровождается болезненными ощущениями у пациента. Однако использование коллоидных систем, содержащих СаР-частицы с включенными препаратами, может позволить вводить в организм водный раствор и избежать органических растворителей [52].

В CaP-частицы были включены противоопухолевые препараты – кофейная кислота, хлорогеновая кислота и цисплатин для лечения остеосаркомы [111]. Полученные частицы, диаметр которых составлял 50-60 нм, состояли из аморфного фосфата кальция. Кинетику вымывания препарата изучали при pH плазмы крови 7,4 и pH лизосом 4,5. Было показано, что высвобождение лекарств из частиц происходило быстрее при более низких значениях pH (Рис. 5), что обусловлено повышением растворимости фосфата кальция при уменьшении pH среды [111].

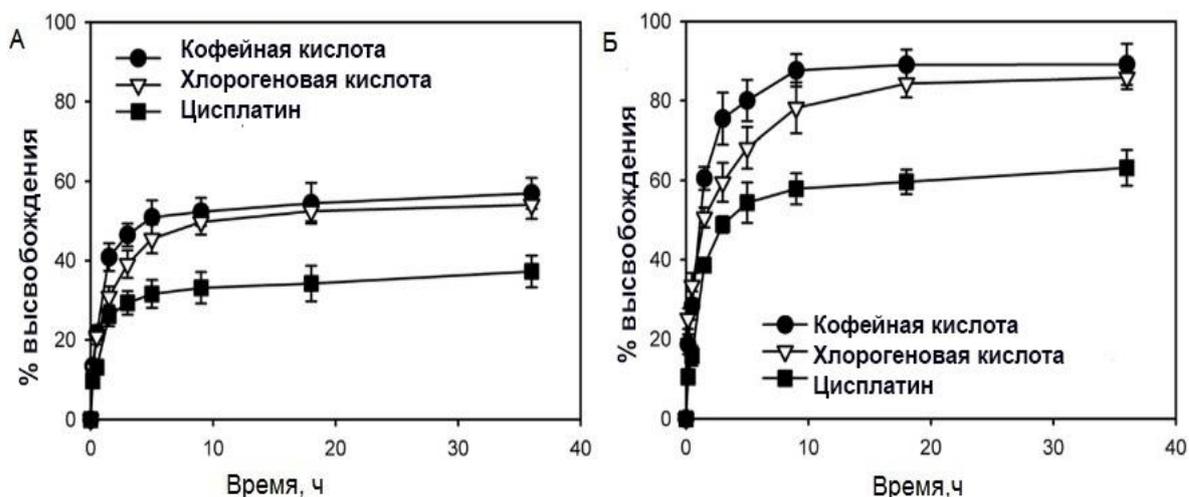


Рис. 5. Кинетика десорбции лекарственных средств из CaP-частиц при различных pH: А – pH 7,4; Б – pH 4,5 [111].

Включение 5-фторурацила в CaP-частицы, полученные гидротермальным методом с использованием микроволнового излучения, позволило добиться повышенного клеточного поглощения и pH-чувствительного высвобождения ионов Ca^{2+} и препарата [104]. Усиление противоопухолевого действия 5-фторурацила происходило за счет накопления Ca^{2+} , что дополнительно увеличивало проницаемость митохондриальной мембраны и запускало апоптоз раковых клеток [104].

Доставка нуклеиновых кислот

В целом ряде работ рассматривается потенциальная возможность доставки нуклеиновых кислот в составе CaP-частиц [105,112–115]. Перспективными для использования в генной терапии являются малые интерферирующие РНК (миРНК) – встречающиеся в природе некодирующие одноцепочечные шпильки РНК длиной около 20–25 нуклеотидов. Они обладают огромным потенциалом для лечения различных заболеваний, включая рак, вирусные инфекции и генетические нарушения, так как можно получить миРНК, подавляющие экспрессию любого гена-мишени [113]. Включение миРНК в состав различных носителей способно предотвратить деградацию в кровотоке под действием РНКаз, а также обеспечить доставку в необходимые органы или ткани.

Наночастицы фосфата кальция являются наилучшим носителем, поскольку они обладают сильным сродством к связыванию с нуклеиновыми кислотами и позволяют получить частицы наиболее подходящего размера для доставки генов внутрь клеток – 25-50 нм [73,116].

Включение миРНК в СаР-частицы с липидным покрытием было предложено для лечения рака молочной железы [105]. Эффективность инкапсуляции повышалась с 36% до 75% при снижении соотношения Са:Р от 400 до 25 [105]. При этом, стабильность миРНК в составе СаР-частиц к РНКазам плазмы крови увеличивалась при понижении соотношения Са:Р от 400 до 100. По-видимому, это связано с большим количеством миРНК, связывающимся с поверхностью частицы при высоком соотношении Са:Р, в то время как с увеличением концентрации фосфата (то есть более низким отношением Са:Р) большее количество миРНК эффективно инкапсулируется в ядра СаР, что приводит к повышенной устойчивости миРНК по отношению к ферментативному расщеплению [105].

С помощью СаР-частиц возможна доставка ДНК для трансфекции клеток. СаР-частицы, содержащие ДНК, обычно получают путем соосаждения фосфата кальция из растворов с последующей быстрой коллоидной стабилизацией полиэлектролитами, в частности, нуклеиновыми кислотами [117]. В качестве защитного покрытия может быть нанесена оболочка из диоксида кремния, бифосфоната, полиэтиленгликоля (ПЭГ) [97,118] и т.д.

Получение вакцин на основе фосфата кальция

Частицы фосфата кальция являются одними из наиболее часто применяемых неорганических нанoadъювантов [119]. Фосфат кальция обладает высоким адъювантным потенциалом в индукции иммунного ответа против различных инфекционных заболеваний. В сравнительном исследовании наночастиц на основе фосфата кальция, хитозана и гидроксида алюминия было показано, что СаР-частицы, конъюгированные с поверхностным белком наружной мембраны *B. Melitensis*, вызывали наибольший иммунный ответ у мышей: наблюдалось повышение уровня антител и цитокинов при вакцинации [119].

Показано использование частиц на основе фосфата кальция, покрытых поливинилпирролидоном и ПЭГ, для изготовления вакцины для профилактики Ньюкаслской болезни птиц [6]. Полученные частицы имели размер 95-100 нм и обладали кристаллической структурой гексагонального гидроксиапатита. С ними конъюгировали вирус Ньюкаслской болезни. Применение частиц с концентрацией, не превышающей 100 мг/мл, не оказывало токсического влияния на клетки организма, но при этом наблюдался

сильный цитокиновый ответ в клетках селезенки. Следовательно, частицы имели перспективы в качестве носителя для эффективной доставки вируса *in ovo*.

Получена вакцина против вируса иммунодефицита человека на основе фосфата кальция [79]. Ядро СаР-частицы было нагружено универсальным Т-хелперным эпитопом столбнячного анатоксина, а поверхность модифицирована стабилизированными тримерами белков оболочки вируса. Полученные наночастицы имели средний диаметр твердого ядра 45 нм (по данным СЭМ) и обладали ζ -потенциалом около +27 мВ благодаря стабилизирующему полимеру полиэтиленмину [79]. Было показано, что в отличие от тримеров белков оболочки в растворе, тримеры в составе СаР-частиц индуцировали активацию нативных специфических В-клеток *in vitro*. У мышей, ранее вакцинированных против столбняка, были вызваны более сильные гуморальные иммунные ответы против белков оболочки вируса после иммунизации СаР-частицами, чем у невакцинированных мышей [79].

Доставка неорганических ионов

С помощью СаР-частиц возможна доставка неорганических ионов, поскольку возможно их встраивание в кристаллическую решетку фосфата кальция – допирование. Например, носители на основе гидроксиапатита могут использоваться для транспортировки радионуклидов в место опухоли [78]. Было показано, что частицы, полученные методом соосаждения, обладали стержнеобразной формой 120x36 нм, а полученные ферментативным гидролизом – как правило, имели сферическую форму с размером около 50 нм и образовывали агрегаты [78]. В частицы вводили ионы меди-64,67, цинка-69m, свинца-211, иттрия-90, рутения, циркония-89, висмута и его хлоридных комплексов [74,75,78,100]. Для включения ионов в гидроксиапатит использовали методы соосаждения и сорбции. Было показано, что наиболее эффективным способом включения металла в состав носителя являлось соосаждение. При допировании, во-первых, происходила аморфизация образца, а во-вторых, разрушение части кристаллов носителя вне зависимости от включаемого иона [78].

Допирование фосфата кальция возможно не только двухвалентными металлами (Cu, Zn, Pb), но и одновалентными, как, например, серебро. Были получены частицы Ag-замещенного гидроксиапатита [71]. Полученные образцы имели антибактериальную активность, как к грамположительным, так и к грамотрицательным бактериям [71].

Доставка лекарственных средств в офтальмологии

В нескольких работах рассмотрена возможность применения СаР-частиц в офтальмологии. В работе [92] были получены СаР-частицы, состоящие из гидроксиапатита, в которые впоследствии включали метазоламид – ингибитор карбоангидразы, понижающий

внутриглазное давление (ВГД). Частицы характеризовались диаметром 256 нм и ζ -потенциалом -30 мВ. В экспериментах *in vivo* было показано, что эффективность метазоламида в составе частиц превосходила не только эффективность его водной формы, но и коммерческого препарата – бринзоламида.

Еще одним препаратом, включенным в СаР-частицы, был лизиноприл – ингибитор ангиотензин-превращающего фермента (АПФ), способный снижать ВГД [120], при этом частицы покрывали целлобиозой [53]. Частицы характеризовались гидродинамическим радиусом 170-306 нм и ζ -потенциалом -17 мВ. Эксперименты по кинетике десорбции лизиноприла из частиц показали, что равновесие между ингибитором в частицах и 0,15М NaCl наступало практически мгновенно, причем процент десорбции лизиноприла достигал лишь 8-12%. При каждой следующей смене элюата высвобождалось только 4-5%, что указывало на высокое сродство ингибитора к СаР-частицам. В экспериментах *in vivo* было показано, что лизиноприл, включенный в состав кальций-фосфатных частиц, вызывал значительно более сильное (примерно в 2 раза) и пролонгированное снижение внутриглазного давления по сравнению с водным раствором ингибитора [53].

Также в СаР-частицы, покрытые целлобиозой, включали β -адреноблокатор тимолол – препарат для терапии глаукомы [8]. Частицы обладали гидродинамическим радиусом 30-200 нм и ζ -потенциалом -12 мВ. Показано более эффективное включение препарата в частицы методом соосаждения по сравнению с сорбцией. Высвобождение препарата из частиц до 95% происходило в течение 1 часа. По сравнению с лизиноприлом [53], тимолол легче высвобождался из частиц. Включение препарата в СаР-частицы препарата позволило увеличить эффективность и пролонгировать его действие в экспериментах *in vivo*.

В СаР-частицы возможно также включение не только низкомолекулярных соединений, но и высокомолекулярных, например, в частицы включали ферментный препарат – супероксиддисмутазу 1 (СОД1) [7] Они характеризовались гидродинамическим радиусом 230 нм и ζ -потенциалом -4 мВ. Оценка противовоспалительного действия при экспериментальном иммуногеном увеите у кроликов показала более эффективное влияние СОД1 в частицах по сравнению с водным раствором.

1.3.4. Цитотоксичность носителей на основе фосфата кальция и их метаболизм

Несмотря на то, что фосфат кальция является структурным компонентом костей и зубов, это не исключает негативные эффекты при введении СаР-частиц в организм. Эффект может зависеть от размера частиц, морфологии, фазового состава и концентрации частиц. Были изучены наночастицы гидроксиапатита четырех различных форм (короткие стержни, длинные стержни, сферы, иглы) с типичными размерами от 10 до 50 нм [121,122].

Наночастицы всех форм ингибировали рост первичных остеобластов крысы в диапазоне концентраций от 20 до 100 мг/л [121], а при дозах от 100 до 200 мг/л наблюдались неблагоприятные генотоксические и цитотоксические эффекты на клетках крови человека [122]. Игольчатые частицы обладали более высокой цитотоксичностью [121,122]. Оценка гемосовместимости (тест на гемолиз, адгезию тромбоцитов, активацию тромбоцитов и измерение времени свертывания крови) показала, что образцы гидроксиапатита являлись материалами с высокой гемосовместимостью и не оказывали неблагоприятного воздействия на компоненты крови (эритроциты и тромбоциты) [123].

Показано, что введение больших (больше 0,25 мг/мл) доз наночастиц фосфата может приводить к накоплению внутриклеточного кальция и индуцировать митохондриальный апоптоз [124]. При анализе действия частиц гидроксиапатита (диаметром 20 и 80 нм, и микрочастиц) на остеобластоподобные клетки оказалось, что самые маленькие частицы вызывали наибольшую пролиферацию клеток и обладали наименьшей цитотоксичностью [124].

Почти все наночастицы фосфата кальция, описанные в литературе, поглощаются пиноцитозом, эндоцитозом или фагоцитозом [124,125]. Показано, что анионные и катионные наночастицы фосфата кальция сферической формы с диаметром 120 нм поглощались эндоцитозом клетками HeLa [126]. Катионные наночастицы фосфата кальция сферической формы (75 нм) сначала попадают в раннюю эндосому, а затем в лизосому, где они, наконец, растворяются в кислой среде в течение нескольких часов [127]. После растворения кальций-фосфатных носителей остаются ионные нетоксичные компоненты Ca^{2+} и PO_4^{3-} , что предотвращает накопление частиц и вызывает внутриклеточное высвобождение лекарственного средства [124,126–128]. Ионы высвобождались из клетки в течение следующих 48 часов, как было показано для клеток карциномы мочевого пузыря человека [128]. Это предотвращало летальное увеличение концентрации внутриклеточного кальция.

Таким образом, широта области применения частиц на основе фосфата кальция как носителей для препаратов различной природы существенно зависит от их индивидуальных характеристик, таких, как размер и поверхностный заряд. Поэтому, помимо уже доказанной биосовместимости и биоразлагаемости самих CaP-частиц, немаловажным является изучение их модификаций, полученных с использованием покрывающих и стабилизирующих агентов, которые могут значительно влиять на свойства частиц и повышать эффективность систем доставки лекарственных препаратов на их основе.

1.4. Хитозан и его свойства

Для собственной защиты слизистые выделяют вязкую жидкость, состоящую, главным образом, из гликопротеинов (в основном из муцина). Ее основные функции – защищать и смазывать поврежденный эпителий, а также препятствовать проникновению микроорганизмов и сторонних веществ в организм. По оценкам, муцины имеют молекулярную массу в диапазоне от 500 кДа до 20 МДа и способны образовывать гелевый матрикс из-за их ассоциации друг с другом посредством нековалентных гидрофобных взаимодействий, водородных связей между остатками сахаров и дисульфидных связей между остатками цистеина [129]. Большинство муцинов заряжены отрицательно из-за наличия сиаловых кислот, которые полностью ионизированы при физиологических pH. Взаимодействия между мукоадгезивными полимерами и поверхностью слизи включают сначала смачивание и адсорбцию двух поверхностей для создания тесного поверхностного контакта. Смачиванию способствуют гидрофильные группы, которые несут мукоадгезивные полимеры, создавая нековалентные – водородные или ионные связи с заряженными группами слизи. Далее полимерные макромолекулы и гликопротеины слизи могут взаимодействовать или взаимопроникать через образованную поверхность раздела, усиливая мукоадгезивный контакт [130].

Таким образом, можно усилить взаимодействие системы доставки лекарственного средства с глазом можно с помощью использования носителей, имеющих положительный заряд [130,131]. В качестве полимера для получения положительно заряженных частиц можно использовать природный полисахарид хитозан [131,132]. Хитозан представляет собой линейный полисахарид, состоящий из случайно связанных 1,4-[2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозы] и 1,4-[2-ацетиламино-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозы] [131]. Хитозан обладает рядом преимуществ, выделяющих его на фоне других биополимеров: биосовместимость, гидрофильность, нетоксичность, высокая биодоступность, простота модификации, химическая стойкость, способность образовывать пленки, гели, наночастицы и микрочастицы, а также сродство к металлам, белкам и красителям [11]. Хитозан получают путем щелочного деацетилирования хитина (Рис. 6). Основным источником для его получения служат ракушки и панцири крабов [10].

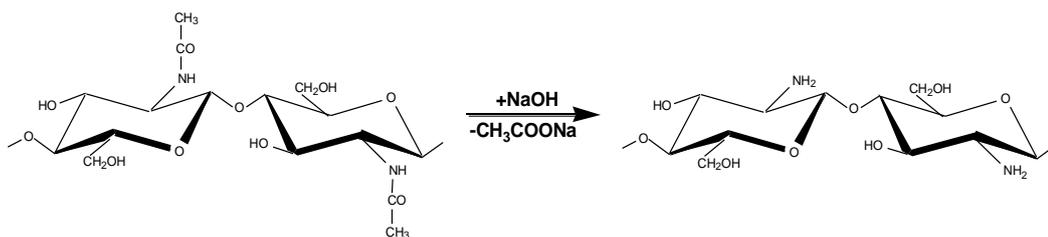


Рис. 6. Реакция щелочного гидролиза хитина [130].

Хитозан является гетерогенным биополимером и различается не только по размеру цепей, но и по степени деацетилирования. Эти характеристики могут влиять на свойства носителей на основе хитозана.

Одним из важных свойств хитозана является мукоадгезивность – способность удерживаться на слизистых оболочках [133]. В первую очередь она обуславливается электростатическим притяжением между положительно заряженными протонированными аминогруппами и отрицательно заряженными остатками муцинов, помимо этого присутствует вклад водородных связей и гидрофобных взаимодействий [133]. Адгезия систем доставки к слизистой оболочке позволяет нацеливать их на определенные ткани и пролонгировать действие препаратов за счет увеличения времени контакта носителя с поверхностью слизистой, а также повышает стабильность включенных лекарственных средств [130].

Ограничения использования хитозана

Одной из проблем использования хитозана является его низкая растворимость [134]. Исследование растворимости хитозана от его молекулярной массы (использовали образцы 3,3-300 кДа) и pH среды показало, что при значениях pH 5,0 и 6,0 вне зависимости от молекулярной массы растворимость хитозана составляла примерно 10 мг/мл. Однако при pH 7,0 образцы с 3,3 кДа и 7,1 кДа сохраняли свою растворимость, а при дальнейшем увеличении молекулярной массы происходило резкое уменьшение растворимости: образец 29,2 кДа сохранял 50% растворимости, 72,1 кДа – около 5%, 156 кДа – 1%, а образец с молекулярной массой 300 кДа вообще не растворялся [135].

Необходимость снижения pH для получения носителей на основе хитозана ограничивает его применение для доставки лекарств и генов, поскольку многие биомолекулы денатурируют при низких значениях pH. Кроме того, носители на основе хитозана, полученные в кислой среде, попадая в среду с нейтральными или основными значениями pH после их местного или системного введения в организм человека, будут терять стабильность и осаждаться [134].

Другая проблема использования хитозана – ограниченное время циркуляции систем доставки на его основе в организме, так как они могут подвергаться ферментативному расщеплению до олиго- или моносахаридов [136]. Хитозан в первую очередь разлагается лизоцимом в плазме крови, клетках печени, тканях почек до фрагментов меньше 10 кДа. Выведение олигосахаридных остатков хитозана преимущественно происходит через почки [137]. На время выведения, по-видимому, влияет степень деацетилирования хитозана: после внутрибрюшинного введения время удерживания хитозана со степенью деацетилирования

50% *in vivo* было всего 24 часа у мышей [137], в то время как время удерживания хитозана со степенью деацетилирования 93% составляло до 210 дней в случае крыс [138].

Повысить растворимость хитозана и предохранить его от деградации в организме можно, используя его производные [139]. Вследствие наличия в хитозане аминогрупп с высокой реакционной способностью, а также гидроксильных групп, возможна модификация молекул. Основными производными хитозана являются триметилхитозан, карбоксиметилцеллюлоза-хитозан, тиолированный хитозан, гликоль-хитозан, хитозан-катехин, метилпирролидинон-хитозан, циклодекстрин-хитозан [130,139]. Большинство из них растворимо в воде и не подвергается ферментативному расщеплению [130,140]. Модификация хитозана может приводить к увеличению проникновения частиц в клетку, увеличить/уменьшить цитотоксичность [139]. Таким образом, можно увеличить время пребывания носителей в организме, что может обеспечить длительное высвобождение лекарств, и, следовательно, пролонгацию и усиление их действия.

Биоцидные и антиоксидантные свойства хитозана

Наиболее важными факторами, играющими роль в антибактериальном и антигрибковом действии хитозана, являются молекулярная масса, степень деацетилирования и полимеризации хитозана, а также тип микроорганизмов, на которые хитозан действует [141]. Было доказано, что хитозан взаимодействует с клеточной стенкой бактерий и грибов и изменяет ее структуру. Существуют два механизма антимикробной активности хитозана. Один из них заключается в увеличении проницаемости плазматических мембран бактерий или грибов за счет электростатических взаимодействий между аминогруппами в цепи хитозана и отрицательно заряженными мембранами бактериальных клеток, что приводит к утечке внутриклеточного материала и гибели клетки [11]. Второй касается изменений в экспрессии генов за счет взаимодействия хитозана с нуклеиновыми кислотами микроорганизма [142]. Хитозан вызывал делеции в генах *Saccharomyces cerevisiae*, тем самым нарушая экспрессию генов и вызывая гибель клетки. Нарушение синтеза белка хитозаном было подтверждено тестом на экспрессию β -галактозидазы *in vivo*, предполагающим, что это основной способ противогрибкового действия [143].

Активные формы кислорода (АФК) являются побочными продуктами окислительного метаболизма, в основном посредством митохондриального дыхания. В норме существует равновесие между прооксидантной и антиоксидантной активностью, однако при его нарушении может происходить накопление АФК. Образующиеся в результате метаболизма радикалы могут атаковать белки, мембранные липиды и ДНК, повреждая их [144]. Окислительный стресс сопровождает многие заболевания, например,

болезни Альцгеймера и Паркинсона, рак, глаукома и т.д. [144]. Хитозан и его производные обладают антиоксидантной активностью [141,145]. Употребление водорастворимого хитозана внутрь в течение 4 недель здоровыми добровольцами приводило к снижению уровня глюкозы в плазме, увеличению липопротеинов высокой плотности и увеличивало общую антиоксидантную активность плазмы [146]. Все образцы хитозана с молекулярной массой от 1130 Да до 156 кДа обладали антиокислительными свойствами, которые проявлялись ярче при использовании хитозана с низкой молекулярной массой [147,148].

1.5. Хитозановые частицы и покрытые хитозаном частицы

В различных работах встречается использование хитозана и его производных как материала для синтеза наночастиц [12,132,149], так и в качестве покрывающего агента. Покрывание позволяет изменить свойства носителя (размер, заряд) [47,49,54,150], увеличить эффективность включения препарата [151,152], повысить стабильность систем доставки при хранении [49,54,152], пролонгировать действие препарата [152]. Носители как на основе хитозана, так и покрытые хитозаном могут быть нацелены на определенные органы и ткани, чья поверхность покрыта муцинами: желудок [152], слизистая носа [48], роговица [49,153]. Например, частицы на основе поли(D,L-лактид-ко-гликолида) (ПЛГА), покрытые хитозаном и содержащие флоретин в основном, локализовались в легких, в то время как непокрытые были обнаружены в печени и селезенке [151]. В нескольких работах были получены наночастицы на основе ПЛГА с хитозановым покрытием [48,152]. Частицы ПЛГА без покрытия появлялись как в желудке, так и в двенадцатиперстной кишке через 2 часа после введения дозы, а через 8 часов можно было обнаружить только в двенадцатиперстной кишке [152]. Напротив, частицы, покрытые хитозаном, наблюдались в желудке в огромном количестве даже через 8 часов после введения дозы, тогда как незначительное количество было обнаружено в двенадцатиперстной кишке [152]. Частицы ПЛГА с хитозановым покрытием, содержащие гидрохлорид ропинирола – противопаркинсоническое средство, показали полное высвобождение лекарственного средства в моделированном растворе назального электролита в течение 24 часов и увеличили проникновение препарата через слизистую носа овец в 3,22 раза по сравнению с непокрытыми частицами [48].

1.5.1. Методы получения хитозановых частиц и покрытия частиц хитозаном

Ионотропное гелеобразование

Наиболее распространенным методом получения хитозановых частиц и покрытия различных носителей хитозаном является ионотропное гелеобразование [12]. Этот метод позволяет осуществлять покрытие в мягких условиях без использования органических

растворителей, что делает возможным его применение для получения носителей для доставки медицинских препаратов. Образование частиц или покрытия, получаемых с помощью данного метода, происходит за счёт связывания молекул хитозана посредством ионных мостиков при добавлении к его раствору вспомогательного агента, имеющего несколько отрицательно заряженных групп. В различных работах применяются следующие агенты: β -глицерофосфат натрия [154], альгинат [155], лецитин, пектин [58], триполифосфат натрия (ТПФ) и другие анионы [156–158], например, цитрат [159]. Кроме того, шивку можно производить анионными полисахаридами – гилауронатом [149] или альгинатом [9]. При этом, данные полисахариды обладают мукоадгезивными свойствами, что в перспективе может улучшить адгезию носителей к поверхности глаза.

Наиболее подходящим агентом для иотропного гелеобразования является ТПФ, так как он позволяет получать частицы с узким распределением по размерам при определенных соотношениях хитозан:ТПФ, способен к быстрому гелеобразованию при контакте с хитозаном, а также хорошо растворим в воде. При одинаковых рН получения плотность шивки с помощью ТПФ значительно выше, чем при использовании цитрата, что, по-видимому, связано валентностью анионов: пятивалентный ТПФ образует большее число связей с хитозаном, нежели цитрат [160]. При использовании ТПФ образование ионных мостиков происходит в результате взаимодействия отрицательно заряженных фосфатных групп и положительно заряженных аминогрупп хитозана (Рис. 7).

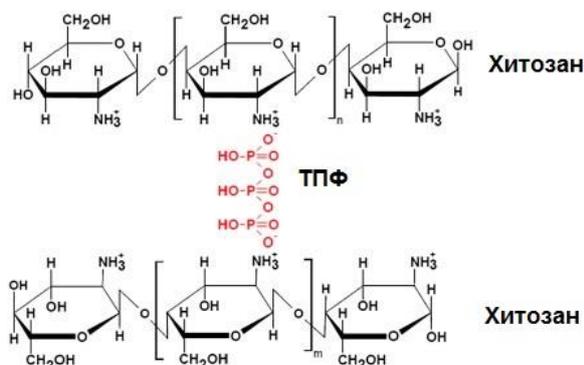


Рис. 7. Схема связывания молекул хитозана с помощью ТПФ.

Размер частиц, состоящих хитозаном, сильно зависит от соотношения хитозан:ТПФ. Показано, что образование частиц в достаточной для анализа концентрации происходит при использовании узкой области массовых соотношений хитозана и ТПФ между 1:0,25 и 1:0,2, соответственно. При меньшем количестве ТПФ частицы образовывались в очень малых концентрациях, а при использовании более близких концентраций хитозана и вспомогательного агента наблюдалась агрегация частиц [54,161].

Например, методом ионотропного гелеобразования с использованием ТПФ производили покрытие СаР-частиц, содержащих антиглаукомный препарат тимолол и ингибитор АПФ лизиноприл [54]. Для покрытия СаР-частиц использовался хитозан, характеризующийся молекулярной массой около 85 кДа и степенью деацетилирования 89%. Оптимальное соотношение хитозан:ТПФ составило 1:0,14.

Ковалентная сшивка

Хитозан обладает большим числом боковых аминогрупп, по которым можно производить сшивку [10,11]. Частицы на основе хитозана могут быть синтезированы путем ковалентного сшивания такими агентами, как глутаровый альдегид, формальдегид, эпихлоргидрин и т.д. [9,162,163] Однако использование большинства из них ограничивается вследствие их токсичности.

Другие методы

Помимо ионотропного гелеобразования и ковалентной сшивки для получения хитозановых частиц существуют методы микроэмульсии [164], выпаривания растворителя [165], восстановительного метилирования [166], однако они применяются реже вследствие более сложных методик получения, а также из-за необходимости использовать органические растворители.

1.5.2. Применение хитозановых частиц и покрытых хитозаном в офтальмологии

Существует широкий ряд работ, посвященных хитозановым частицам (Табл. 3), а также частицам с хитозановым покрытием (Табл. 4) для применения в офтальмологии.

Как видно из приведенных данных, хитозановые частицы, а также покрытые им, обладают положительным зарядом (чаще всего более +10 мВ) и размером в несколько сотен нм. Исследования *in vitro* наночастиц хитозана в моделируемых жидкостях, содержащих компоненты слизи (муцин и лизоцим), показали, что присутствие лизоцима не влияло на стабильность наночастиц хитозана в слезной жидкости [167], при этом снижение ζ -потенциала указывало на связывание хитозана и муцина [167,168]. В экспериментах *in vivo* препараты в составе хитозановых частиц показывали улучшенное проникновение препаратов сквозь клетки роговицы [153,166,169,170] и более сильный терапевтический эффект, например, снижение ВГД [169], уменьшение воспаления [166,171]. В свою очередь хитозановое покрытие приводило к увеличению эффективности и пролонгации действия препаратов в составе частиц, покрытых хитозаном, по сравнению с непокрытыми и препаратом в растворе [172–174], улучшению биодоступности и проникновению препаратов сквозь роговицу [46,49,173].

Табл. 3. Примеры хитозановых частиц для доставки препаратов в офтальмологии

Метод получения – гелеобразование с ТПФ

Включаемое вещество	Размер, нм	ζ , мВ	Процент включения, %	Высвобождение <i>in vitro</i>	Действие <i>in vivo</i>	Ссылка
Диклофенак	336	+23	31%	До 70% в первые 30 минут	Наночастицы проявляли значительно более высокую антибактериальную активность против <i>S. aureus</i> и <i>B. subtilis</i>	[175]
Ресвератрол и кверцетин (частицы ПЭГилированы)	14-755	-	62-92%	50% за 4-8 часов	В экспериментах <i>ex vivo</i> проникновение ресвератрола в составе частиц через клетки роговицы было в 6 раз выше по сравнению со свободным препаратом. Препараты в составе частиц показали устойчивое и усиленное снижение ВГД ($5,5 \pm 0,5$ мм рт. ст.) у нормотензивных кроликов	[169]
Даптомицин	142-204	+30	81-38%	100 % за 3 часа.	При инкубации <i>in vitro</i> с муцином показано связывание с частицами	[167]
Розмариновая кислота	280	+30	60%	-	Наночастицы не цитотоксичны в отношении пигментного эпителия сетчатки и линии клеток роговицы человека	[168]
Мелоксикам	195-597	+17,3-57,0	70-96%	Высвобождение до 50% за 10 часов с последующим плато	Частицы не вызывали изменений в тканях глаза. Показано более быстрое выздоровление животных при инстилляциях препарата в составе частиц	[171]
Инсулин	215-282	+18-31	44-66%	77% через 12 часов	Проникновение инсулина из наночастиц через роговицу через 12 ч составило $73,4 \pm 4,8\%$. Глазное введение инсулина в составе частиц показало отсроченный, но более выраженный ответ в снижении уровня глюкозы в крови при сравнении с простым инсулином	[170]

Метод получения – ковалентная сшивка

Продолжение табл. 3.

Включаемое вещество	Размер, нм	ζ , мВ	Процент включения, %	Высвобождение <i>in vitro</i>	Действие <i>in vivo</i>	Ссылка
Дексаметазон	286	+11	2,55 (процент замещения)	Высвобождение дексаметазона до 80% за 8 часов с последующим плато до 48 часов	С помощью флуоресцентной микроскопии показано проникновение препарата в составе частиц через роговицу и более длительное удержание во внутренней области глаза	[153]
Дексаметазон	707-957	+21-38	71-76%	Полностью высвобождался за 25 часов	Частицы с дексаметазоном не являются цитотоксичными и проявляют противовоспалительную активность, сравнимую с чистым дексаметазоном. Тестирование осмотической резистентности эритроцитов показало, что как частицы обладают большей мембраностабилизирующей способностью, чем дексаметазон.	[176]

Другие методы получения

Включаемое вещество	Метод получения	Размер, нм	ζ , мВ	Процент включения, %	Высвобождение <i>in vitro</i>	Действие <i>in vivo</i>	Ссылка
Диклофенак	Восстановительное метилирование триметилхитозана	131-188	+4-9	75-96%	При pH 6,5 и 7,4 высвобождение около 20%	Показано более долгое удержание препарата в составе частиц в водянистой влаге кроликов	[166]
Байкалеин	Выпаривание растворителя (триметилхитозан)	163	+27	91%	Высвобождение до 60% за 12 ч, а затем более медленное до 100% до 48 ч	По сравнению с раствором препарата, препарат в частицах показал значительное увеличение времени удерживания в слезах.	[165]
Каптоприл	Нанопреципитация с фталатом ацетата целлюлозы	248-427	-	12-61%	70% за 2 часа	Проявляли цитотоксичность на клетках при использовании количества частиц эквивалентных 405 мкМ каптоприла: снижали жизнеспособность клеток примерно на 60%.	[177]

Табл. 4. Примеры частиц с хитозановым покрытием для применения в офтальмологии								
Основа частицы	Включаемое вещество	Метод покрытия	Размер, нм	ζ , мВ	Процент включения, %	Высвобождение <i>in vitro</i>	Действие <i>in vivo</i>	Ссылка
Твердые липидные наночастицы	Метазоламид	Эмульгирование/испарение	248	+34	59%	50% через 2 часа, 100% через 8 часов	Вызывает падение ВГД у кроликов на 40%, эффект сохраняется до 8 часов	[172]
Липидные наночастицы	Флурбипрофен	Адсорбция	68-170	+18-21	98-99%	-	При закапывании в глаз площадь под фармакокинетической кривой для препарата в составе покрытых частиц увеличивалась в 7,7 раз по сравнению с частицами без покрытия.	[174]
Наночастицы альгинат/хитозан	5-фторурацил	Гелеобразование с альгинатом	329–505	+19–29	6–27%	81% за 8 часов	При закапывании препарата в составе частиц в глаз наблюдалась в 4 раза более высокая концентрация, чем у препарата в растворе	[49]

Продолжение табл. 4.								
Основа частицы	Включаемое вещество	Метод покрытия	Размер, нм	ζ , мВ	Процент включения, %	Высвобождение <i>in vitro</i>	Действие <i>in vivo</i>	Ссылка
ПЛГА наночастицы	Форсколин	Эмульсионный метод	201	+10	72%	90% за 72 часа	Гамма-сцинтиграфия показала хорошее распределение и удержание состава на поверхности роговицы по сравнению с раствором лекарства	[46]
Бычий сывороточный альбумин	Тетрандрин	Ковалентная сшивка с помощью глутарового альдегида	238	+24	96%	57% через 48 часов	Покрытые хитозаном частицы показали более выраженное снижение ВГД по сравнению с раствором тетрандрина и препарата в непокрытых частицах. Максимальное снижение ВГД на $49,35 \pm 2,13\%$ наблюдалось через 4 часа	[173]

1.6. Совместное применение хитозана и фосфата кальция

Как было показано выше, и фосфат кальция, и хитозан являются биосовместимыми и биodeградируемыми материалами, что делает их привлекательными для применения в медицине. Поэтому возможно их совместное применение в рамках композита или системы доставки [96,110,178–186].

Взаимодействие между хитозаном и фосфатом кальция изучалось методом ИК-Фурье спектроскопии (инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье) [178,182,187,188]. Показано, что связывание полимера и неорганической части может быть связано с образованием полифосфонатной соли между фосфатом кальция и аминогруппами хитозана [178,182,187,188], а также с хелатным взаимодействием Ca^{2+} с протонированными аминогруппами хитозана [178].

Композиты и нанокompозиты на основе фосфата кальция и хитозана могут применяться в тканевой инженерии [178,179,185,188], покрытия имплантатов [189], лечении ран [190] в качестве носителя лекарственных средств [54,96,182] и нуклеиновых кислот [183,184].

Тканевая инженерия

Скаффолды (клеточные матрицы, которые вводятся с целью регенерации костей) имплантируются в пациента для восполнения дефекта и стимуляции регенерации поврежденной ткани. Поскольку и хитозан, и фосфат кальция являются остеоиндуктивными и остеокондуктивными материалами, на их основе делают композитные материалы для тканевой инженерии [178,179,185,188]. Например, был получен нанобиокompозит фосфат кальция/гликоль-хитозан для инженерии костной ткани путем растворения гликоль-хитозана в 75% ортфосфорной кислоте с добавлением гидроксида кальция [185]. Эксперименты продемонстрировали, что нанокompозиты CaP /гликоль-хитозан являются остеоиндуктивными для мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека [185]. Помимо остеоиндуктивности скаффолды могут приводить к пролиферации клеток [188], а также к клеточной дифференциации [178].

Доставка лекарственных средств

Создание новых систем доставки необходимо для повышения эффективности действия препарата [54,178,182], его защиты от деградации [96], нацеливания на определенные органы и ткани [183]. Композиты на основе хитозана и фосфата кальция подходят для получения носителей лекарств, благодаря возможности контролировать свойства частиц, высокой эффективности инкапсуляции препаратов и замедленному высвобождению [54,96,178,182,184].

Композиты на основе хитозана и фосфата кальция могут использоваться в качестве платформы для перорального введения вакцины. Однако существуют проблемы при использовании такого метода: пероральное введение белковой или пептидной вакцины осложняется деградацией антигена в кислой среде желудочно-кишечного тракта, слизистыми барьерами и неэффективным клеточным поглощением иммунными клетками. Для преодоления этих проблем изучали композиты на основе полисахаридов/фосфата кальция для пероральной доставки белковых антигенов [96]. В качестве модельного белка использовали бычий сывороточный альбумин, а в экспериментах с клетками и животными – овалбумин. Бычий сывороточный альбумин в составе композита имел довольно высокий процент включения (около 58%), пролонгированное высвобождение. Данные о клеточном поглощении и стимуляции макрофагов показали, что хитозановое покрытие увеличивает поглощение антигена эпителиальными клетками кишечника и макрофагами [96]. Эксперименты *in vivo* продемонстрировали, что пероральное введение овалбумина в составе наночастиц, покрытых альгинатом и хитозаном, значительно усиливало выработку антител - иммуноглобулинов IgA и IgG в сыворотке слизистых оболочек по сравнению с непокрытыми частицами [96].

Сочетание фосфата кальция и хитозана также предложено для использования в офтальмологии. В состав покрытых хитозаном CaP-частиц включали β -адреноблокатор тимолол, а также ингибитор АПФ лизиноприл для применения в офтальмологии [54]. Используемый хитозан имел среднюю молекулярную массу 89 кДа и степень деацетилирования 87%. Гидродинамический радиус частиц составлял 70 нм, а поверхностный заряд – +17 мВ. Процент включения лизиноприла оказался в 7,5 раз больше (75%), чем процент включения тимолола (10%), также было зафиксировано гораздо более медленное высвобождение лизиноприла из частиц в физиологическом растворе. Методом рентгеноспектрального микроанализа было установлено, что частицы содержали аморфную фазу состава $Ca_x(PO_4)_y \cdot zH_2O$ и кристаллическую состава $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ (брушит). В экспериментах *in vivo* было показано усиление терапевтического эффекта тимолола в составе наночастиц по снижению ВГД в сравнении с раствором препарата. Следует отметить, что процент включения лизиноприла в покрытые хитозаном CaP-частицы был значительно выше, чем в покрытые целлюбиозой, по-видимому, из-за электростатического взаимодействия между хитозаном и препаратом, но высвобождение происходило быстрее [53,54]. Проблема при использовании этого хитозана заключалась в его крайне низкой растворимости: он растворялся только в среде с низким значением pH и при использовании ультразвуковой обработки. CaP-частицы с хитозановым покрытием

перспективны для использования в офтальмологии, однако необходимы исследования с более удобными в работе видами хитозана.

Материалы на основе фосфата кальция и хитозана имеют широкие перспективы как по использованию этих композитов в тканевой инженерии и хирургии, так и для доставки лекарственных средств

1.7. Ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АПФ)

Ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС) играет ключевую роль в регуляции артериального давления и гомеостаза жидкости организма и является мишенью лечения сердечно-сосудистых и почечных заболеваний [30]. Ангиотензин II и альдостерон являются двумя наиболее мощными биологически активными продуктами РААС, вызывающими основные действия РААС: вазоконстрикцию, задержку натрия, а также провоспалительные и профибротические эффекты [17,30]. АПФ – цинк-зависимая пептидаза, в организме катализирующая гидролиз неактивного пептида ангиотензина I в вазоконстриктор ангиотензин II. Также АПФ катализирует разложение вазодилатора брадикинина, который расширяет сосуды за счет образования NO (монооксид азота) и увеличивает их проницаемость [17,30].

Ингибиторы АПФ широко применяются терапии сердечно-сосудистых заболеваний [22]. Обычно коммерческие препараты на основе ингибиторов АПФ имеют в качестве активного вещества проформу ингибитора, которая подвергается гидролизу в печени, превращаясь в активную форму [191]. Помимо этого, иногда используют ингибиторы сразу в активной форме: эналаприлат, каптоприл, лизиноприл (Рис. 8).

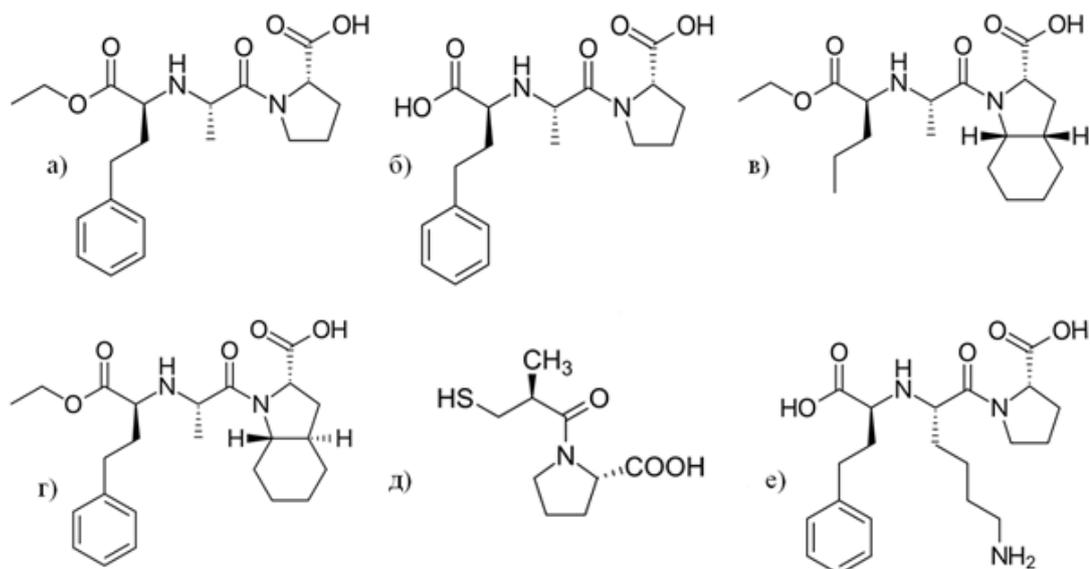


Рис. 8. Структуры некоторых ингибиторов АПФ: а) эналаприл, б) эналаприлат, в) трандолаприл, г) периндоприл, д) каптоприл, е) лизиноприл.

1.7.1. Механизм влияния компонентов РААС на развитие и лечение глазных заболеваний

Заболевания глаз, такие как диабетическая ретинопатия, возрастная макулярная дистрофия, глаукома и катаракта, являются ведущими причинами слепоты во всем мире [39]. Эти глазные заболевания (кроме катаракты) связаны с локальным или системным нейрональным и сосудистым гомеостазом. Важнейшей патофизиологической особенностью заболеваний является нейродегенерация ганглиозных клеток сетчатки, к которой приводит повышение внутриглазного давления (ВГД) – давления жидкости внутри глаза [14]. Его постоянное значение определяется сочетанием продукции и дренажа водянистой влаги. Известно, что цилиарные тела выделяют водянистую влагу, а отток внутриглазной жидкости обеспечивается трабекулярной сетью, в которой существуют коллагеновые волокна, способные сокращаться, тем самым уменьшая отток [14]. Нарушение баланса продукции и оттока внутриглазной жидкости приводит к повышению ВГД, что, в свою очередь, может привести к развитию ишемии – нарушению кровоснабжения тканей в связи с механическим сдавливанием сосудов в глазу, что приводит, в первую очередь, к гипоксии. Ишемия – наиболее часто встречающийся патологический процесс, сопровождающий такие заболевания глаза, как диабетическая ретинопатия, травматические повреждения глаза, а также вызывающий дистрофические заболевания сетчатки, глаукому и так далее [192].

Большинство компонентов РААС, включая проренин, ренин, ангиотензиноген, АПФ, ангиотензин II присутствуют в ганглиозных клетках сетчатки и цилиарном теле [18,19,193]. Было показано, что при наличии интактного гемато-ретиального барьера уровни ангиотензина I и ангиотензина II в глазной ткани нормальных глаз свиньи в 5–100 раз выше, чем это можно было бы объяснить контаминацией кровью, тем самым доказывая существование внутриглазной РААС, независимой от циркулирующей РААС [194]. Ангиотензин II, связываясь с рецепторами AT1 в цилиарном теле, приводит к увеличению секреции внутриглазной жидкости [192]. NO и простагландины, образованные под действием брадикинина, приводят к расслаблению волокон трабекулярной сети и оттоку внутриглазной жидкости [192]. Эти данные указывают на то, что глазная РААС может участвовать в формировании водянистой влаги, ее дренировании и регуляции ВГД. Таким образом, компоненты РААС способны влиять на ВГД за счет регуляции продукции и оттока внутриглазной жидкости.

Нарушение активности компонентов внутриглазной РААС может приводить к возникновению некоторых глазных заболеваний, например, АПФ может принимать

участие в развитии заболеваний, связанных с изменением ВГД [20], воспалением и ишемией тканей глаза [22–24,195]. Повышение активности АПФ наблюдается в слезе у больных диабетической ретинопатией [28,40,41] и на модели глубокого щелочного ожога у кроликов [196], а также при заболеваниях, связанных с повышением ВГД и ишемией тканей глаза [24,194]. Имеются сведения о терапевтическом действии ингибиторов АПФ при дистрофии сетчатки глаза [27], диабетической ретинопатии [28], ожоговой болезни глаз [24] и глаукоме [29]. Ингибиторы АПФ, снижая активность АПФ и предотвращая расщепление брадикинина, запускают синтез простагландинов, что приводит к снижению ВГД за счет увеличения оттока внутриглазной жидкости. Кроме того, они также уменьшают образование водянистой влаги за счет уменьшения кровотока в цилиарном теле. Таким образом, ингибиторы АПФ оказывают значительное влияние на гидродинамику глаза: происходит увеличение оттока и уменьшение продукции внутриглазной жидкости и, в результате, происходит снижение ВГД (Рис. 9) [18,120,197].

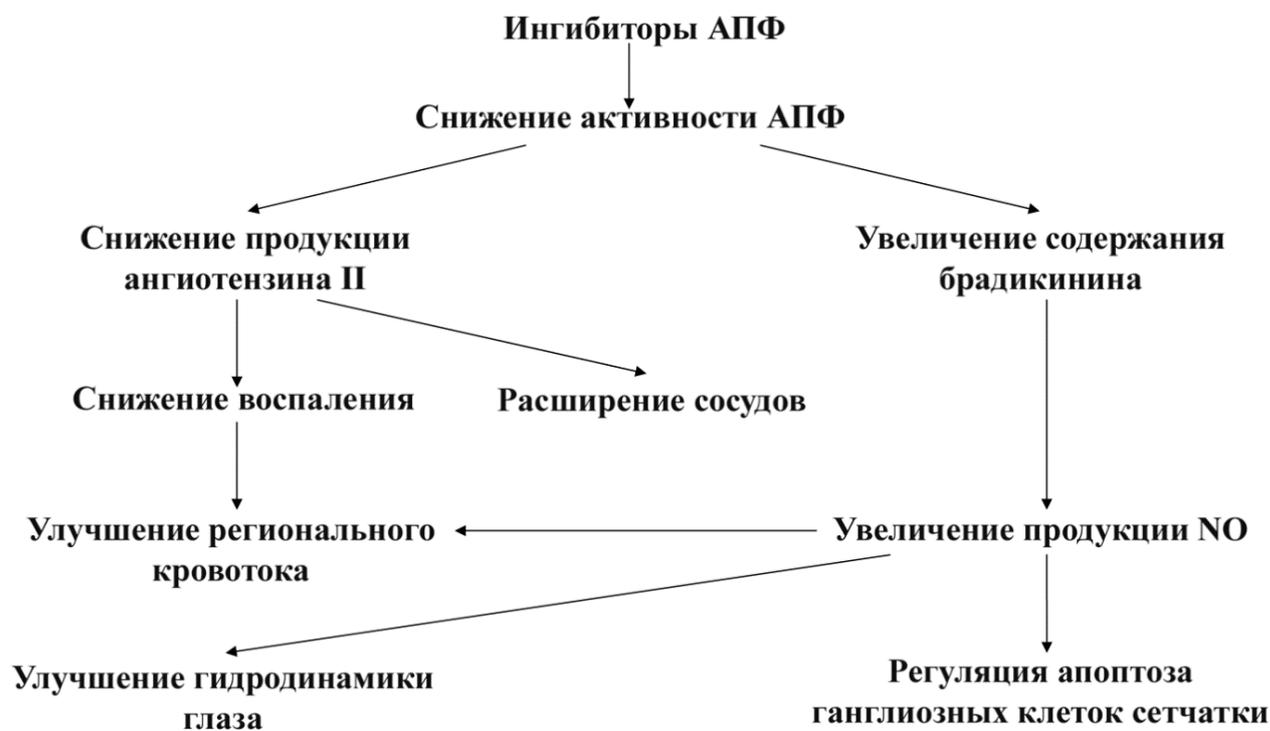


Рис. 9. Влияние ингибиторов АПФ на основные звенья патогенеза глаукомы [120].

Необходимо также отметить, что продукт гидролиза ангиотензина I - ангиотезин II является провоспалительным фактором и способствует индуцированию окислительного стресса [18], а также индуцирует выработку ангиогенного фактора – фактора роста эндотелия сосудов [198]. Несколько клинических и экспериментальных исследований показали, что РААС играет важную роль в прогрессировании диабетической ретинопатии и старческой макулярной дистрофии, предположительно посредством ангиотензина II и рецепторов AT1 [198]. Ангиотезин II потенцирует опосредованный фактором роста

эндотелия сосудов ангиогенез и увеличивает проницаемость кровеносных сосудов сетчатки, поэтому повышается риск неоваскуляризации и гиперпроницаемости [18].

Таким образом, применение ингибиторов АПФ позволяет снизить концентрацию ангиотензина II, что способствует уменьшению симптомов заболеваний, таких как воспаление [26], ишемия [23,24,199], окислительный стресс [40]. Например, капельные инстилляциии ингибиторов АПФ при воспалении, вызванном щелочным ожогом у кроликов, приводили к значительному снижению площади и глубины эрозии роговицы, а также сокращению площади ишемии и восстановлению кровообращения в зоне ожога по сравнению с интактными кроликами [24]. Представленные данные указывают на эффективность местного применения ингибиторов АПФ для улучшения микроциркуляции при ишемических состояниях, стимулирования восстановления собственных тканей, снижения проявлений воспаления и ускорения течения репаративных процессов после травмы.

1.7.2. Включение ингибиторов АПФ в носители

Повысить биодоступность ингибиторов АПФ можно путем включения в носители как в частицы неорганической, в том числе СаР-частицы [53,54,200–202], так и органической природы, в частности, полимерные [177,203–205] и липидные частицы [206] (Табл. 5).

Частицы с включенными ингибиторами АПФ предлагались как для перорального применения [177,203], так и для внутривенного введения [200,201,204], а также для капельных инстилляций в глаз [53,54]. Терапевтическое действие ингибиторов АПФ в составе частиц может быть направлено на снижение как общего кровяного [177,203–205], так и локального (внутриглазного) давления [53,54], а также они способны оказывать антиангиогенное действие (совместно с геном) на опухоли [201]. Помимо этого, лизиноприл может выступать в качестве усилителя контраста в МРТ [200].

Табл. 5. Ингибиторы АПФ в составе носителей.

Носитель	Препарат	Характеристики	Процент включения, %	Высвобождение <i>in vitro</i>	Действие <i>in vivo</i>	Ссылка
Магнитные наночастицы оксида железа с хитозановым покрытием	Периндоприл	15 нм (размер без покрытия 6 нм)	62%	72% через 94 ч при pH 7,4 или 86% через 46 ч при pH 4,8.	Частицы оксида железа и нанокompозит с покрытием не были токсичными в клеточной линии фибробластов человека.	[202]
Комплекс золотая наночастица/миРНК/каптоприл/полиэтиленимин	Каптоприл	72 нм, +16 мВ	-	-	Исследование на мышах, несущих ксенотрансплантаты опухоли показало, что комплексы обладают удовлетворительной способностью нацеливания на опухоль и сильной противоопухолевой активностью.	[201]
Наночастицы хитозана/ацетат фталата целлюлозы	Каптоприл	427 нм	61%	70% через 2 ч высвобождение с линейной кинетикой от 0 до 2 ч и 85% через 24 ч.	На неонатальных фибробластах человека показана цитотоксичность при обработке наночастицами в количестве, эквивалентном 405 мкМ каптоприла.	[177]
Частицы циклодекстрина	Каптоприл	-	34%	-	Продемонстрировано более эффективное снижение артериального давления каптоприлом в составе частиц по сравнению с раствором.	[205]

Продолжение табл. 5.

Носитель	Препарат	Характеристики	Процент включения, %	Высвобождение <i>in vitro</i>	Действие <i>in vivo</i>	Ссылка
Частицы ПЛГА, стабилизированные плуроником F-68	Лизиноприл	267 нм -35 мВ	93	75% за 7 дней	-	[204]
Суперпарамагнитные частицы γ -Fe ₂ O ₃ -SiO ₂	Лизиноприл	21 нм -30 мВ	-	Через 14 часов 68% (рН 7,4), 88% (рН 4,8)	Лизиноприл в составе частиц в качестве контрастного вещества для магнитно-резонансной томографии повышает чувствительность T2-взвешенных изображений по сравнению с пустыми частицами.	[200]
СаР/целлобиоза	Лизиноприл	306 нм -17 мВ	37%	Быстрое вымывание препарата до 10% при каждой смене элюента.	Показано более эффективное (в 1,5-2 раза) и пролонгированное действие препарата в составе частиц по снижению ВГД по сравнению с раствором.	[53]
СаР/хитозан	Лизиноприл	130 нм +17 мВ	75%	90% за 30 мин	-	[54]

Продолжение табл. 5.

Носитель	Препарат	Характеристики	Процент включения, %	Высвобождение <i>in vitro</i>	Действие <i>in vivo</i>	Ссылка
ПММА (полиметилметакрилат) частицы	Эналаприлат	297 нм -59 мВ	24%	Скорость высвобождения из частиц ПММА и ПЛГА одинакова в воде, желудочном соке с рН 1,2 и кишечном соке с рН 7,5. За 1 мин высвобождалось 60–70% препарата.	В экспериментах <i>ex vivo</i> показано отсутствие повышения эффективности проникновения эналаприлата в желудочно-кишечный тракт при загрузке в ПЛГА частицы.	[203]
ПЛГА частицы		204 нм -33,4 мВ	46%			
Твердые липидные наночастицы	Рамиприл	104–334 нм	73-86%	от 55 до 81% через 12 ч.	-	[206]

Эффективность включения препарата в носитель зависела в первую очередь от природы включаемого вещества. Ингибиторы АПФ лизиноприл и эналаприлат имеют низкий индекс липофильности, [207], что обеспечивало высокую эффективность их включения в частицы на основе гидрофильного полимера ПЛГА и в неорганические CaP-частицы [53,54,203,204]. Тогда как включение эналаприлата в частицы на основе более гидрофобного полимера ПММА происходило менее эффективно [203]. Липофильные ингибиторы каптоприл и рамиприл, напротив, более эффективно взаимодействовали с гидрофобными носителями [201,206].

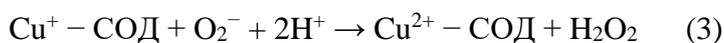
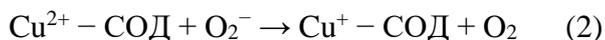
Ингибиторы АПФ, понижая активность АПФ, приводят к широкому спектру физиологических эффектов: понижению общего и локального давления, снижению воспаления, антиоксидантному и антиангиогенному действию, улучшают проницаемость сосудов. Поэтому местное применение ингибиторов для регуляции процессов в глазу для лечения заболеваний, связанных с повышением ВГД, ишемией, воспалением, представляется перспективным.

1.8. Супероксиддисмутаза

Активные формы кислорода (АФК) – нормальные метаболиты кислорода в клетке, которые образуются в результате дыхания либо при иммунной реакции на патогены, либо при развитии некоторых заболеваний, а также при действии ионизирующего излучения [144]. К АФК относят супероксидный анион-радикал (O_2^-), пероксид водорода (H_2O_2) и гидроксильный радикал (HO^\bullet). Нормальные функции АФК включают индукцию иммунной системы и активацию систем ионного транспорта [144]. Обычно антиоксиданты регулируют концентрацию АФК, однако при нарушении баланса между их образованием и деградацией возникает окислительный стресс [144]. Поскольку АФК могут играть роль медиаторов внутриклеточных сигнальных путей в иммунных клетках, их продукция может приводить к гиперактивации воспалительных реакций и повреждению тканей [144].

Внутри клетки существуют защитные механизмы контроля АФК, которые состоят из супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатиона и других внутриклеточных окислительно-восстановительных пар. Супероксиддисмутазы являются одними из наиболее важных средств защиты от кислородных радикалов [31]. СОД в качестве кофактора содержит катион переходного металла: у млекопитающих обнаружены медно-цинковые СОД1 и СОД3 и марганцевая СОД2. СОД1 локализуется в цитоплазме в виде гомодимера 32 кДа, СОД2 представляет собой гомотетрамер 88 кДа, локализованный исключительно во внутреннем митохондриальном пространстве, СОД3 – тетрамерный гликопротеин 135 кДа, который находится во внеклеточном пространстве.

У аэробных организмов СОД нейтрализует супероксид-радикал, образующийся в цитозоле, митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме клеток путем его дисмутации на кислород (2) и пероксид водорода (3).



Поскольку супероксиддисмутаза обладает одними из наиболее высоких констант скорости реакций, реакция дисмутации супероксид-радикала является диффузионно-контролируемой, и ее скорость определяется только частотой столкновения субстрата и фермента [31]. Среди всех супероксиддисмутаз СОД1 обладает самой высокой константой скорости реакции $2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [31]. Образующуюся перекись водорода перерабатывает каталаза, превращая в воду и кислород, в то время как глутатионпероксидаза использует перекись водорода для окисления глутатиона с образованием глутатиондисульфида и воды [208]. Изoeлектрическая точка СОД1 составляет 4,5.

Нарушение антиоксидантной функции либо токсическое усиление функции СОД связаны с такими заболеваниями, как атеросклероз (СОД2), диабетическая ретинопатия (внеклеточная СОД3), а синдром Дауна, болезнь Паркинсона, рак и боковой амиотрофический склероз были связаны с СОД1 [31]. Регуляция активности СОД может помочь в терапии данных заболеваний.

Известно, что СОД1 снижает воспаление [209], ускоряет заживление поражений кожи, вызванных ожогами, системной красной волчанкой и герпесом [210,211], защищает культивируемые нейроны человека при окислительном стрессе [212], уменьшает ишемически-реперфузионное повреждение мозга [213], продлевает жизнеспособность α -клеток поджелудочной железы [214].

1.8.1. СОД в офтальмологии

Супероксид-анион реагирует с оксидом азота (NO) с образованием высокотоксичного пероксинитрита (схема 4). Снижение содержания оксида азота может приводить к нарушению оттока внутриглазной жидкости и повышению ВГД. При развитии воспаления усиливается синтез как NO, так и супероксид-радикалов. Катализируя реакцию дисмутации супероксид-радикала, СОД ингибирует его связывание с NO, тем самым фермент может косвенно участвовать в расслаблении сосудов и снижении давления, в частности, внутриглазного [32].



Окислительный стресс является спутником множества различных заболеваний глаза таких, как увеит, глаукома, возрастная макулодистрофия, диабетическая ретинопатия,

болезнь сухого глаза и др. [16,215]. Поскольку СОД напрямую влияет на количество АФК, то с помощью экзогенной СОД можно корректировать течение этих заболеваний. Например, инстилляцией препарата Эрисод (эритроцитарная СОД1) способствовали нормализации внутриглазного давления, увеличению оттока водянистой влаги, улучшению остроты зрения при первичной открытоугольной глаукоме [216]. Также был зарегистрирован препарат под названием Рексод на основе рекомбинатной СОД1 человека. Он обладал нейропротекторным действием при экспериментальной глаукоме и способствовал более быстрому заживлению роговицы после оперативного вмешательства [217]. Помимо этого, было показано, что при иммунногенном увеите СОД1 повышала антиоксидантную активность и снижала количество лейкоцитов в водянистой влаге по сравнению с инстилляциями дексаметазона [218].

Помимо антиоксидантного и гипотензивного действия СОД обладает нейропротекторным действием [31]. Показано, что уровень супероксид-аниона в слое ганглиозных клеток сетчатки 6-месячных мышей с дефицитом СОД1 был значительно выше, чем у мышей дикого типа [219]. Это привело к истончению слоя нервных волокон и уменьшению концентрации нейрофиламентов – белков, которые являются основным каркасом аксонов. Количество ганглиозных клеток сетчатки у 6-месячных мышей с дефицитом СОД1 сильно снизилось при неизменном ВГД, хотя у 2-месячных мышей этого не наблюдалось. Таким образом, дефицит СОД1 вызывает патологию ганглиозных клеток сетчатки, что может быть связано с течением нормотензивной глаукомы.

1.8.2. СОД в составе носителей

Основными факторами, ограничивающими терапевтическое использование супероксиддисмутазы, являются ее короткий период полувыведения из плазмы (6 минут у крыс и 25 минут у человека) [220], низкая клеточная проницаемость, низкое накопление в пораженной области и быстрое выведение почками из кровотока [221]. Эти проблемы можно решить с помощью подходящей системы доставки (Табл. 6).

В основном для включения СОД применяются полимерные носители: ПЛГА [44], хитозан [222], блоксополимеры [215]. Помимо этого, продемонстрирована возможность включения СОД в неорганические носители: ватерит [56], фосфат кальция [7,55], оксид церия [223].

Табл. 6. Супероксиддисмутаза в составе носителей.

Носитель	Метод получения	Характеристики	Процент включения, %	Высвобождение <i>in vitro</i>	Действие <i>in vivo</i>	Ссылка
ПЭГилированные липосомы	Нанопреципитация с использованием прямого микрожидкостного стеклокпилляра.	135 нм, -0,6 мВ	59 ± 6	-	СОД в липосомах более эффективно снижала воспаление (65% ± 8%), по сравнению с СОД в растворе (20% ± 13%).	[224]
Микросферы хитозана	Коацервация	1,38 - 1,94 мкм	36% (рН 3,0) 88% (рН 5,0)	80% через 1 сутки, 100% через 4 сутки	-	[222]
Нанозимы	Образование комплексов СОД – катионный блоксополимер метокси-поли(этиленгликоль) ₁₁₃ -блок-поли(L-глутамат натрия) ₅₀	45 нм, -7 мВ	89%	За 140 часов 50% при элюции фосфатным буфером и 80% - буфером Hepes	Статистически достоверное снижение клинических проявлений увеита у кроликов по сравнению с водным раствором СОД.	[34]
ПЛГА частицы	Испарение растворителя	81 нм -25 мВ	75%	Кумулятивное высвобождение 8% происходит в течение 24 часов и 78% примерно в течение 90 дней.	Нейропротекторный эффект зависел от концентрации СОД в составе частиц: 100% клеток выживали при дозе >100 ЕД СОД, а 60% при более низких дозах. Эффект наблюдался в течение 6 ч после H ₂ O ₂ -индуцированного окислительного стресса.	[44]

Продолжение табл. 6.						
Носитель	Метод получения	Характеристики	Процент включения, %	Высвобождение <i>in vitro</i>	Действие <i>in vivo</i>	Ссылка
Конъюгат 4-(бромометил)-фенилборной кислоты с дендримером	Полученный дендример способен формировать наночастицы с СОД при простом перемешивании за счет образования координационных связей между атомами азота и борат-ионами, а также за счет ионных взаимодействий.	106-220 нм +18 мВ	-	-	По сравнению со свободной СОД, наноформа показала повышенную терапевтическую эффективность, снижая апоптоз ганглиозных клеток сетчатки путем уменьшения экспрессии малонового диальдегида и повышения уровня глутатиона в тканях глаза, тем самым подавляя окислительный стресс.	[33]
Наночастицы оксида церия	Сорбция СОД	2 нм	-	-	Антиоксидантная активность конъюгатов CeO ₂ -СОД оказалась существенно выше, чем чистой СОД и диоксида церия.	[223]

Носитель	Метод получения	Характеристики	Процент включения, %	Высвобождение <i>in vitro</i>	Действие <i>in vivo</i>	Ссылка
Микрочастицы карбоната кальция	Соосаждение	3,4-3,8 мкм	93%	Высвобождение 30% СОД, затем происходило замедление, полностью СОД вымывалась за 3 часа из-за перекристаллизации и кристаллов ватерита в непористые кристаллы кальцита.	-	[56]
СаР-частицы с покрытием целлобиозой	Соосаждение	660 нм -4 мВ	50%	Равновесие за 30 минут при 25-30% высвобождения. После смены элюента равновесие через 30 минут вымывалось еще 25-30%. Для полного высвобождения достаточно 4 промывок физраствором.	Продемонстрировано на модели иммуногенного увеита у кроликов, что частицы более эффективны в лечении воспаления, чем водный раствор СОД. При их применении заметно уменьшились отек радужки и роговицы, отек и гиперемия век, количество фибрина в передней камере глаза.	[7]

Включение супероксиддисмутазы в частицы разной природы статистически достоверно повышало эффективность терапевтического действия СОД в экспериментах *in vivo*: СОД проявляла антиоксидантную [33,44,223] и нейропротекторную активность [33,44], а также приводила к снижению воспаления при увеите [7,215,224].

Итак, частицы на основе фосфата кальция представляются перспективными носителями субстанций для использования в офтальмологии. Оптимизация условий синтеза СаР-частиц позволит нам получить носители, способные проникать сквозь роговицу, за счет синтеза частиц с необходимым для этого гидродинамическим диаметром менее 500 нм и узким распределением по размеру. Подбор условий для эффективного покрытия частиц фосфата кальция хитозаном обеспечит положительный заряд поверхности носителя и его мукоадгезивность. Хитозановое покрытие позволит усилить контакт носителя с поверхностью глаза, что, в свою очередь, может привести к увеличению времени удерживания включенных препаратов в слезной жидкости и увеличению эффективности их проникновения внутрь глаза. Подбор условий включения в такие носители низкомолекулярного ингибитора АПФ и фермента супероксиддисмутазы 1 обеспечит эффективную загрузку препаратов в носитель. Таким образом, мы можем ожидать более эффективное и пролонгированное действие включенных препаратов на внутриглазное давление.

2. Материалы и методы

2.1. Материалы

А) Для получения СаР-частиц и гибридных частиц:

CaCl₂ – «Химмед» (Россия);

K₂HPO₄·7H₂O – «Хеликон» (Россия);

Na₃C₆H₅O₇·5,5H₂O (цитрат натрия) – «Химмед» (Россия);

5 кДа хитозан – степень деацетилирования >90%, средняя молекулярная масса 5 (4-6) кДа – «Sigma» (США);

Гликоль-хитозан – степень деацетилирования ≥60%, средняя молекулярная масса 72 кДа, – «Sigma» (США),

Триполифосфат натрия – «Acros» (США);

Б) Включаемые соединения

Ингибитор АПФ эналаприлат ((2S) – 1-[(2S) -2-[(1S) -1-карбокси-3-фенилпропил]амино} пропаноил] пирролидин-2-карбоновая кислота) – «U.S. Pharmacoreial Convention» (США);

СОД1 – рекомбинантная супероксиддисмутаза 1 человека (препарат «Рексод», ООО НПП «Ферментные технологии», Россия), удельная активность 94 kU/мг;

В) Для определения концентрации эналаприлата:

АПФ, выделенный из легких быка по методу [225,226];

Субстрат АПФ – N-карбобензоксид-L-фенилаланил-L-гистидил-L-лейцин (Cbz-Phe-His-Leu, ZPHL) – «Bachem» (США);

Нерес – N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N-(2-этансульфоновая кислота) – «Sigma» (США);

Метанол – «Merck» (Германия);

Ортофталевый альдегид – «Sigma» (США);

Г) Для определения активности СОД1:

Кверцетин – «Химснаб-СПБ» (Россия);

Диметилсульфоксид (ДМСО) – марки х.ч., перегнанный в вакууме в токе аргона;

Этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА) – «Reanal» (Венгрия);

Тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) – «Helicon» (Россия).

Остальные препараты отечественного производства марок х.ч. и о.с.ч.

2.2. Методы получения и исследования частиц *in vitro*

Все растворы были приготовлены на деионизованной воде и предварительно отфильтрованы с использованием фильтров фирмы «Millipore» (Германия) с диаметром пор 0,45 мкм, помимо раствора триполифосфата натрия (ТПФ), который фильтровали, используя фильтр с диаметром пор 0,2 мкм.

2.2.1. Получение кальций-фосфатных частиц

Для получения частиц использовалась модифицированная методика, основанная на работах [8,102].

СаР-частицы получали при фиксированном соотношении объемов растворов гидрофосфата калия, цитрата натрия и хлорида кальция, составляющем 5:1:5 соответственно. Например, к 4,55 мл 12,5 мМ раствора гидрофосфата калия добавляли 0,91 мл 15,6 мМ раствора цитрата натрия. После этого одновременно с включением ультразвукового гомогенизатора Bandelin Sonopuls (Германия) добавляли 4,55 мл 12,5 мМ раствора хлорида кальция. Обработку ультразвуком проводили в постоянном режиме.

В ходе экспериментов по определению влияния условий получения частиц на их размеры варьировали следующие параметры: мощность ультразвукового воздействия (40-200 Вт), время ультразвукового воздействия (10, 20, 30 минут), рН раствора гидрофосфата калия (рН 6,8; 7,0; 7,5; 8,8), температура (15°, 70°C), концентрацию цитрата натрия (0-78,0 мМ), диаметр емкости, в которой происходила обработка ультразвуком (20-40 мм). Также обработку ультразвуком проводили в интервальном режиме (10 минут ультразвук, 10 минут перерыв, 10 минут ультразвук).

2.2.2. Получение гибридных частиц

Гибридные частицы получали путем покрытия хитозаном неорганического корра фосфата кальция. Покрытие хитозаном производили по модифицированной методике, основанной на работе [54,227].

А) Покрытие 5 кДа хитозаном

Для покрытия СаР-частиц 5 кДа хитозаном готовили раствор хитозана в деионизованной воде и доводили его рН до значения 3,9. Исходный раствор, содержащий СаР-частицы, полученные по методике, описанной в п. 2.2.1., доводили до различных значений рН, так, чтобы конечный рН в суспензии после добавления хитозана составлял 5,3; 5,7; 6,0. Далее к этому раствору при постоянном интенсивном перемешивании на

магнитной мешалке по каплям добавляли водный раствор хитозана до конечного соотношения СаР:хитозан=2:1 по объему. К полученной смеси, не прекращая перемешивания, по каплям добавляли водный раствор ТПФ с концентрацией 1 мг/мл. При подборе условий покрытия частиц использовали различные концентрации хитозана (1 или 0,5 мг/мл) и различные объемные соотношения ТПФ:хитозан (1:1; 0,25:1; 0,2:1; 0,15:1; 0,1:1). После добавления ТПФ смесь оставляли при постоянном перемешивании на ночь при комнатной температуре.

Б) Покрытие гликоль-хитозаном

Для покрытия СаР-частиц гликоль-хитозаном готовили раствор хитозана в деионизованной воде и доводили его рН до значения 7,4. Исходный раствор, содержащий СаР-частицы, полученные по методике, описанной в п. 2.2.1., доводили до различных значений рН, так, чтобы конечный рН в суспензии после добавления хитозана составлял 5,7; 6,8; 7,2. Далее к этому раствору при постоянном интенсивном перемешивании на магнитной мешалке по каплям добавляли водный раствор хитозана до конечного соотношения СаР:хитозан=2:1 по объему. К полученной смеси, не прекращая перемешивания, по каплям добавляли водный раствор ТПФ с концентрацией 1 мг/мл. При подборе условий покрытия частиц использовали различные концентрации хитозана (1 или 2 мг/мл) и различные объемные соотношения ТПФ:хитозан (1:1; 0,25:1; 0,2:1; 0,15:1; 0,1:1). После добавления ТПФ смесь оставляли при постоянном перемешивании на ночь при комнатной температуре.

В) Проверка возможности образования хитозановых частиц в условиях покрытия СаР-частиц хитозаном

Для того, чтобы проверить, образуются ли хитозановые частицы в выбранных нами условиях покрытия хитозаном СаР-частиц, эксперименты проводили в отсутствие солей кальция. Готовили серию растворов 12,5 мМ гидрофосфата калия и 15,6 мМ цитрата натрия со значениями рН, соответствующими конечным значениям рН системы при покрытии (для 5 кДа хитозана 5,3; 5,7; 6,0; для гликоль-хитозана 5,7; 6,8; 7,2). К полученным растворам объемом 1 мл при постоянном интенсивном перемешивании на магнитной мешалке по каплям добавляли 500 мкл водного раствора хитозана с концентрацией 1 мг/мл. Затем, не прекращая перемешивания, по каплям добавляли водный раствор ТПФ с концентрацией 1 мг/мл до объемного соотношения ТПФ:хитозан=0,2:1. Оставляли перемешиваться на ночь при комнатной температуре.

Г) Определение массы образующихся СаР-частиц и гибридных частиц

Пустые СаР-частицы и гибридные частицы диализовали против деионизированной воды с помощью диализных кассет Thermo Scientific Slide-A-Lyzer (США) с размером пор 100 кДа, лиофилизировали и взвешивали полученные образцы.

2.2.3. Получение хитозановых частиц

Получение частиц производилось по модифицированной нами методике, описанной в работе [227]. Готовили растворы хитозана с концентрацией 1 мг/мл (5 кДа хитозан) и 1; 1,5; 2 мг/мл (гликоль-хитозан) и доводили их рН до 5,0 и 6,0 (для 5 кДа хитозана) и 6,3; 6,5; 6,8; 7,1; 7,3 (для гликоль-хитозана). Затем к раствору хитозана при постоянном интенсивном перемешивании на магнитной мешалке по каплям добавляли раствор ТПФ с концентрацией 1 мг/мл. Для выбора оптимальных характеристик образующихся частиц использовали объемные соотношения ТПФ:хитозан (0,25;1; 0,2;1; 0,15;1; 0,1;1) при фиксированной концентрации хитозана. После добавления ТПФ смесь оставляли перемешиваться на ночь при комнатной температуре.

2.2.4. Определение гидродинамического диаметра и поверхностного заряда частиц

Измерение гидродинамического диаметра и поверхностного заряда (ζ -потенциала) частиц производили на установке Zetasizer Nano ZS («Malvern Instrument», Великобритания). Ячейку термостатировали при температуре 25°C. В полистирольную кювету, предварительно промытую деионизированной водой, вносили 750 мкл суспензии частиц в 6 мМ растворе хлорида калия и определяли их средний гидродинамический диаметр и индекс полидисперсности (PDI) частиц с помощью He-Ne лазера мощностью 4 мВт с длиной волны 633 нм при угле обратного рассеяния 173°. Данные были автоматически обработаны с использованием неотрицательного анализа наименьших квадратов (NNLS) (Malvern Co., Ltd., Великобритания).

При измерении ζ -потенциала для удаления избыточных ионов 500 мкл суспензии частиц предварительно помещали на фильтр «Sartorius» (Германия) с размером пор 30 кДа (для непокрытых и полученных с использованием 5 кДа хитозана частиц) и 100 кДа (для полученных с использованием гликоль-хитозана) и концентрировали раствор в 10 раз на центрифуге MiniSpin («Eppendorf», Германия). Затем раствор доводили до первоначального объема деионизированной водой и повторяли вышеописанную процедуру дважды. Полученную суспензию разбавляли до 800 мкл деионизированной водой и вносили в U-образную кювету с золотыми электродами («Malvern Instrument», Великобритания).

Данные о гидродинамическом диаметре и ζ -потенциале были представлены в виде среднего минимум 3 значений. Результаты были автоматически обработаны с помощью программы Zetasizer v.7.03.

2.2.5. Определение содержания хитозана в гибридных и в хитозановых частицах

Метод определения содержания хитозана основан на взаимодействии свободных аминогрупп хитозана с ортофталевым альдегидом (ОФА) в присутствии N-ацетил-L-цистеина с образованием хромофорного соединения [228].

А) Построение калибровочного графика

Готовили растворы 5 кДа хитозана и гликоль-хитозана в дистиллированной воде с диапазоном концентраций 5-20 мкг/мл. В ячейки 96-луночного полистирольного планшета помещали по 100 мкл раствора хитозана и 100 мкл боратного буфера (рН 8,9), содержащего 4 мМ ортофталевого альдегида и 2,6 мМ ацетилцистеина. Через 40 мин после начала реакции измеряли оптическое поглощение продукта реакции на длине волны 340 нм на многофункциональном ридере «Tecan Infinite». Строили график зависимости оптического поглощения от концентрации хитозана.

Б) Определение содержания хитозана

500 мкл суспензии покрытых хитозаном CaP-частиц помещали в фильтр Sartorius с размером пор 30 кДа – для частиц, полученных при использовании 5 кДа хитозана, 100 кДа – полученных при использовании гликоль-хитозана, и концентрировали на центрифуге MiniSpin при 5400g до минимального объема (25 мкл). Затем доводили сконцентрированную суспензию деионизованной водой до 100 мкл. Далее повторяли методику, описанную в пункте А, но вместо раствора хитозана использовали фильтраты и супернатанты после центрифугирования. С помощью градуировочного графика определяли концентрацию хитозана в образце.

Процент содержания хитозана рассчитывали как отношение массы хитозана в образце к общей внесенной массе хитозана при синтезе частиц.

2.2.6. Исследование морфологии частиц

Морфологию и форму частиц изучали с помощью растровой электронной микроскопии (РЭМ) с использованием двухлучевого автоэмиссионного сканирующего электронно-ионного микроскопа Scios (1-30 кВ) (FEI, США) и с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с использованием автоэмиссионного просвечивающего электронного микроскопа Tecnaі Osiris (30-200 кВ) (FEI, США). Анализировали пустые

непокрытые и покрытые хитозанами СаР-частицы. Образцы предварительно диализовали против деионизированной воды и затем лиофилизировали на проводящем двустороннем углеродном скотче. Особую благодарность за помощь в проведении анализа мы выражаем руководителю ЦКП ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, к.ф.-м.н. Григорьеву Ю.В.

2.2.7. Исследование фазового состава частиц

Изучение фазового состава проводили на рентгеновском дифрактометре RigakuMiniflex 600 (Rigaku, Япония) в режиме отражения с использованием Cu K α -излучения и монохроматора Ni-K β . Параметры генератора рентгеновского излучения в эксперименте: ускоряющее напряжение 40 кВ, ток нагрева катода 15 мА. Суспензию СаР-частиц (непокрытых и покрытых хитозаном) диализовали против деионизированной воды и лиофилизировали. Высушенные частицы ресуспендировали в этаноле. Дифрактограммы для фазового анализа при комнатной температуре снимали в стеклянных кюветах с использованием стандартного стеклянного держателя образцов. Диапазон углового сканирования составлял $2\theta = 7-78^\circ$ с шагом $0,02^\circ$, а скорость сканирования $5^\circ/\text{мин}$. Размер падающего на образец пучка задавался горизонтальной и вертикальной щелями 2 мм и $0,625^\circ$ соответственно. Идентификацию минеральных фаз проводили с помощью программы PDXL (Rigaku Corporation, Япония) и базы данных ICDD PDF-2 (2017). Особую благодарность за помощь в проведении анализа мы выражаем с.н.с. ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, к.х.н., Ивановой А.Г.

2.2.8. Определение площади поверхности частиц

Величины удельной поверхности СаР-частиц определяли по теории БЭТ (Брунауэра, Эммета и Теллера) и модели ВЈН (модель Баррета–Джойнера–Халенда) [229] методом низкотемпературной адсорбции азота в лаборатории катализа и нефтехимического синтеза химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Характеристики пористости образцов определяли на анализаторе Gemini VII 2390 (V1.02t) («Micromeritics», США) по стандартной методике. Перед анализом образцы вакуумировали при 100°C в течение 12 ч при давлении $3 \cdot 10^{-3}$ атм. Изотермы сорбции и десорбции азота регистрировали при температуре 77 К. Расчет пористости структур проводили с использованием стандартного программного обеспечения. Удельная поверхность рассчитана по модели БЭТ на основе данных адсорбции в диапазоне относительных давлений $P/P_0 = 0,05-0,2$. Общий объем пор рассчитан по модели ВЈН при относительном парциальном давлении $P/P_0 = 0,94$.

2.2.9. Включение препаратов в CaP-частицы

А) Метод соосаждения

Необходимое количество эналаприлата или СОД1 или обоих препаратов (для совместного включения) растворяли в 12,5 мМ гидрофосфата калия. Доводили рН полученного раствора до значения 8,8 (для частиц с включенным эналаприлатом) или 7,0 (для частиц с включенной СОД1 или для частиц с совместно включенными препаратами). Получение CaP-частиц и их покрытие хитозаном проводили по методике, описанной в п. 2.2.1. и п. 2.2.2. Конечная концентрация эналаприлата в суспензии составляла 8,6 мкМ – 20 мМ, а СОД1 – 0,19 мг/мл.

Б) Метод сорбции

CaP-частицы и гибридные частицы получали по методикам, описанным в пунктах 2.2.1 и 2.2.2. 500 мкл CaP-частиц помещали на фильтры «Sartorius» с размером пор 10 кДа и концентрировали примерно в два раза. Затем по каплям при медленном перемешивании на магнитной мешалке при комнатной температуре суспензию частиц добавляли к эквивалентному объёму водного раствора эналаприлата с концентрацией 1 мкМ – 36 мМ. Оставляли перемешиваться на ночь при комнатной температуре.

2.2.10. Включение эналаприлата в хитозановые частицы

Включение эналаприлата в хитозановые частицы производили на стадии получения частиц. Необходимое количество эналаприлата растворяли в растворе хитозана. Конечная концентрация эналаприлата в растворе составляла 2,64 мМ. Доводили рН полученного раствора до значения 5,0 (5 кДа хитозан) и 7,1 (гликоль-хитозан). Далее производили синтез хитозановых частиц по методике, описанной в пункте 2.2.3., при соотношении хитозан:ТПФ=1:0,2. Конечная концентрация препарата в растворе, содержащем частицы, составляла 2,2 мМ.

2.2.11. Оценка эффективности включения препаратов

Для оценки эффективности включения препаратов в частицы 500 мкл суспензии частиц, полученной по методике, описанной в п. 2.2.9. и 2.2.10., помещали на фильтры «Sartorius» (Германия) с размером пор 30 кДа. Суспензию частиц концентрировали в 10 раз при 5400 g для удаления невключённых эналаприлата или СОД1. Количество несвязанного с частицами препарата оценивалось в прошедшем через мембрану растворе. Процент включения препарата был рассчитан как соотношение:

$$\text{Эффективность включения} = \frac{c_{\text{исх}} - c_{\text{ф}}}{c_{\text{исх}}} \cdot 100\%$$

где: $c_{\text{исх}}$ – концентрация препарата в исходной суспензии, $c_{\text{ф}}$ – концентрация препарата в фильтрате.

2.2.12. Определение концентрации эналаприлата

Концентрацию эналаприлата в исследуемых образцах определяли, сравнивая эффективность ингибирования ими стандартного раствора АПФ с ингибированием контрольного раствора эналаприлата.

А) Определение активности АПФ

Определение активности АПФ при гидролизе субстрата Z-Phe-His-Leu проводили на флуориметрическом ридере Tecan Infinite M-200 (Австрия), измеряя скорость накопления продукта реакции His-Leu, который образует аддукт с ортофталевым альдегидом, регистрируемый флуориметрически. К исходной смеси объемом 450 мкл, содержащей АПФ с концентрацией 1 нМ в 0,05М Нерес буфере, рН 7,5, содержащем 0,15М NaCl и 1 мкМ ZnCl₂, (буфер А), добавляли 50 мкл 2 мМ Cbz-Phe-His-Leu в метаноле и инкубировали в течение 10 минут при 25°С. Конечная концентрация субстрата в реакционной смеси составляла 0,2 мМ. Время реакции подбирали таким образом, чтобы степень превращения субстрата не превышала 5%. Реакцию останавливали добавлением 250 мкл 1 н. NaOH, вносили 50 мкл ортофталеевого альдегида с концентрацией 20 мг/мл в метаноле, инкубировали смесь 10 минут, затем добавляли 63 мкл 6 н. HCl. Растворы переносили в ячейки 96-луночного полистирольного планшета и измеряли флуоресценцию образованного аддукта продукта ферментативной реакции His-Leu с ортофталевым альдегидом при длине волны возбуждения 370 нм и длине волны эмиссии 500 нм. Фоновую флуоресценцию измеряли так же, но субстрат вносили после добавления NaOH к раствору фермента.

Б) Получение калибровочной зависимости остаточной активности АПФ быка от концентрации эналаприлата

Для определения концентрации эналаприлата в образцах использовали калибровочные зависимости остаточной активности АПФ от концентрации эналаприлата (контроль), из которых определяли значение концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀). Определяли зависимость остаточной активности АПФ при внесении исследуемого образца при разных разбавлениях и определяли IC₅₀. Рассчитывали

концентрацию эналаприлата в образцах, сравнивая экспериментальные значения и контроль.

Для получения кривой ингибирования АПФ контрольным ингибитором использовали концентрации эналаприлата в диапазоне 10^{-11} – 10^{-7} М. Для этого исследуемый раствор эналаприлата последовательно разбавляли в два раза в буфере А. В пробирки типа эппендорф вносили по 45 мкл растворов эналаприлата различной концентрации, добавляли 360 мкл буфера А и 45 мкл раствора АПФ с концентрацией 10^{-8} М. Для установления равновесия инкубировали смесь в течение 1 часа при 25°C в термостатах «Термит» (Россия). Остаточную активность АПФ определяли по методике, описанной в пункте А. Данные представляли в полулогарифмических координатах. В точке, соответствующей половине максимальной активности АПФ, концентрация эналаприлата была равна IC_{50} . Далее, используя величину разбавления в данной точке, рассчитывали исходную концентрацию эналаприлата.

В) Получение кривых ингибирования АПФ филтратами, содержащими эналаприлат

Филтраты, полученные по методике п. 2.2.11., содержащие эналаприлат, разбавляли в тысячу раз в буфере А, затем последовательно разбавляли полученные растворы в два раза. В пробирки типа эппендорф вносили по 45 мкл растворов разбавленных образцов, добавляли 360 мкл буфера А и 45 мкл раствора АПФ с концентрацией 10^{-8} М. Для установления равновесия инкубировали смесь в течение 1 часа при 25°C в термостатах «Термит» (Россия). Остаточную активность АПФ определяли по методике, описанной в пункте А. Содержание эналаприлата в исследуемых образцах определяли, сравнивая данные с контролем.

2.2.13. Определение активности СОД1

Метод определения ферментативной активности СОД1 человека основан на определении степени торможения реакции автоокисления кверцетина. За единицу активности принимают такое количество фермента, которое в течение 20 мин вызывает ингибирование реакции окисления кверцетина на 50% при рН 10,2 и температуре 25°C [230].

В одноразовую спектрофотометрическую кювету помещали 30 мкл измеряемого образца и 900 мкл 0,02 М фосфатного буфера, содержащего 0,08 мМ ЭДТА и 0,08 мМ ТЕМЕД, рН 10,2 (готовился непосредственно в день измерения). Реакцию инициировали

добавлением 30 мкл раствора кверцетина в ДМСО с концентрацией 1 мг/мл. Измеряли оптическое поглощение на УФ спектрофотометре Cary 50 Conc («Varian», США) на длине волны 406 нм непосредственно после добавления кверцетина (D^{+0}) и через 20 минут (D^{+20}). В случае контрольной пробы смешивали в одноразовой кювете 930 мкл буфера и 30 мкл раствора кверцетина и также измеряли оптическое поглощение непосредственно после добавления кверцетина (D^{-0}) и через 20 минут (D^{-20}).

Степень ингибирования определяли по формуле:

$$I = \frac{D^- - D^+}{D^-} \cdot 100\%$$

где $D^- = D^{-0} - D^{-20}$ – изменение оптической плотности при 406 нм за 20 минут в пробе, не содержащей препарат; $D^+ = D^{+0} - D^{+20}$ – изменение оптической плотности при 406 нм за 20 минут наблюдения в пробе, содержащей препарат.

Исходную пробу СОД1 разбавляли так, чтобы процент ингибирования реакции автоокисления кверцетина находился в диапазоне 10-80%. Концентрацию активной СОД1 в исходных образцах определяли по калибровочной зависимости, построенной независимо.

Для получения калибровочной зависимости использовали несколько разбавлений СОД1. Измеряли активность фермента по методике, описанной выше. Концентрацию СОД1, при которой наблюдалось 50% ингибирование реакции автоокисления кверцетина в реакционной среде, принимали равной 1 ед/мл (У/мл), остальные концентрации рассчитывали относительно нее. Затем строили график зависимости процента ингибирования автоокисления кверцетина от десятичного логарифма концентрации СОД1 в исходном растворе.

2.2.14. Кинетика высвобождения препаратов из частиц

Для определения времени высвобождения препаратов из частиц в раствор 500 мкл суспензии частиц, полученной по методике, описанной в п. 2.2.9. и 2.2.10., помещали на отдельные фильтры «Sartorius» (Германия) с размером пор 30 кДа. Суспензию частиц концентрировали в 10 раз при 5400g для удаления невключённых эналаприлата или СОД1. Затем объём над мембранами был одновременно доведён до первоначального (500 мкл) 0,15М раствором NaCl, после чего суспензии инкубировали в течение различных промежутков времени (5, 15, 30, 45, 90, 120, 150, 180 мин) при комнатной температуре. По истечении этого времени суспензии вновь центрифугировали при 5400 g в течение 5 минут. Затем в прошедшей через мембрану жидкости методом, описанным в п. 2.2.6, определяли количество высвободившегося препарата.

Эксперименты по определению кинетики десорбции включаемых в частицы препаратов проводили не менее 2 раз. Математический анализ экспериментальных кинетических кривых *in vitro* проводили с помощью известных математических моделей (первого порядка, Хигучи, Хиксона-Кроуэлла, Корсмейера-Пеппаса), описывающих высвобождение лекарственных веществ из матриц различной химической природы.

Табл. 7. Параметры математических моделей для анализа кинетических кривых высвобождения эналаприлата из непокрытых и покрытых хитозаном CaP-частиц. [231]

Модель	Уравнение
Модель 1 порядка	$\ln\left(1 - \frac{M_t}{M_\infty}\right) = K_1 \cdot t$
Модель Хигучи	$\frac{M_t}{M_\infty} = K_H \cdot t^{\frac{1}{2}}$
Модель Хиксона-Кроуэлла	$\left(1 - \frac{M_t}{M_\infty}\right)^{\frac{1}{3}} = 1 - K_\beta \cdot t$
Корсмейера-Пеппаса	$\frac{M_t}{M_\infty} = K_{KP} \cdot t^n$

2.2.15. Изучение стабильности частиц

Стабильность непокрытых CaP-частицы, как пустых, так и содержащих препараты, а также покрытых 5 кДа хитозаном и гликоль-хитозаном, изучали при хранении в растворе без соли и в присутствии 0,15М NaCl при +4°C в течение двух месяцев, при этом характеризовали частицы по размеру и ζ-потенциалу (п. 2.2.4). Также гибридные частицы обессоливали путем диализа против дистиллированной воды в диализных мешках «Sigma» (США) с размером пор 12 кДа, лиофильно высушивали и хранили в течение месяца при температуре -20 °С. После хранения лиофильно высушенные частицы растворяли в исходном объёме деионизованной воды, определяли гидродинамический диаметр и ζ-потенциал частиц, как описано выше (п. 2.2.6.).

2.2.16. Исследование стабильности СОД1

А) Исследование термостабильности СОД1

Для исследования термостабильности фермента раствор СОД1 с концентрацией 1 мг/мл в деионизованной воде инкубировали в течение 1 часа при температурах 30, 40, 50, 60, 70 и 80°C в термостатах «Термит» (Россия). После инкубации активность СОД1 измеряли в соответствии с п. 2.2.13.

Б) Исследование кинетики инактивации СОД1

Раствор СОД1 с концентрацией 0,3 мг/мл в растворе, содержащем 12,5 мМ гидрофосфата калия, 15,6 мМ цитрата натрия и 25 мМ NaCl, инкубировали при температурах 60°C и 70°C в течение 5, 10, 20, 30 минут в термостатах «Термит» (Россия). После инкубации активность СОД1 определяли в соответствии с п. 2.2.13.

В). Исследование влияния ультразвуковой обработки на активность СОД1

Для исследования влияния ультразвуковой обработки на активность СОД1 растворяли фермент в 12,5 мМ гидрофосфата калия, 15,6 мМ цитрата натрия и 25 мМ NaCl, конечная концентрация СОД1 составила 0,3 мг/мл. Затем растворы подвергали обработке ультразвуком мощностью 200 Вт в течение 10 и 20 минут. После определяли активность СОД1 в соответствии с п. 2.2.13. и сравнивали с активностью СОД1 в растворе, не подвергавшемся ультразвуковой обработке.

2.2.17. Оценка влияния эналаприлата на активность СОД1 и СОД1 на ингибирующую активность эналаприлата

Для оценки влияния СОД1 на ингибирующую активность эналаприлата фермент вносили в раствор эналаприлата до конечной концентрации 0,3 мг/мл и проводили построение кривых ингибирования АПФ образцами, содержащими эналаприлат в соответствии с п. 2.2.12.

Для оценки влияния эналаприлата на активность СОД1 растворяли оба препарата в деионизованной воде до конечных концентраций 3,6 мМ и 0,3 мг/мл соответственно и определяли активность СОД1 по методике, описанной в п. 2.2.13.

2.2.18. ИК-Фурье спектроскопия образцов СаР-частиц

Все образцы пустых СаР-частиц, пустых гибридных частиц (на основе фосфата кальция и 5 кДа хитозана), СаР-частиц и гибридных частиц с совместно включенными СОД1 и эналаприлатом, предварительно концентрировали центрифугированием на мембране 100 кДа «Sartorius» (Германия) для удаления избытка хитозана, СОД1 и эналаприлата. Кроме того, были приготовлены растворы 5 кДа хитозана, СОД1 и эналаприлата в той же концентрации, что и внутри частиц.

ИК-Фурье спектроскопию (ИК-спектроскопию с преобразованием Фурье) проводили на приборе Tensor 27 («Bruker», Германия), оснащенном охлаждаемым жидким азотом детектором МСТ, термостатом («Huber», Германия), ячейкой с нарушенным полным отражением «Bruker» (Германия) и ZnSe кристалл с однократным отражением. Объем

образца составлял 40-50 мкл. Спектры образцов регистрировали трехкратно (каждый раз по 50 сканирований) в диапазоне 3000–900 см⁻¹ с разрешением 1 см⁻¹ при 22 °С. Сухой воздух прокачивался через систему воздушным компрессором «Jun-Air» (Германия). Таким же образом регистрировали фон (деионизованная вода). Спектры анализировали с помощью программы Orus 7.0.

Особую благодарность за помощь в проведении анализа мы выражаем доц. кафедры химической энзимологии МГУ им. М.В. Ломоносова, д.х.н., Кудряшовой Е.В.

2.3. Исследование частиц с эналаприлатом и СОД1, в экспериментах *in vivo*

Эксперименты *in vivo* были проведены в рамках совместной работы в институте глазных болезней им. Гельмгольца под руководством д.б.н., проф. Чесноковой Н. Б. Эксперименты проводили на нормотензивных кроликах мужского пола породы шиншилла массой 2-2,5 кг. Все эксперименты с живыми кроликами были проведены в строгом соответствии с положением Ассоциации исследований в области зрения и офтальмологии по использованию животных в офтальмологических исследованиях и исследованиях зрения. 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.

Следует отметить, что при проведении экспериментов *in vivo* после синтеза частицы не отделялись от препаратов в растворе. Все растворы и суспензии были доведены до рН 7,3-7,5.

2.3.1. Изучение влияния включения эналаприлата и СОД1 в частицы на удерживание препарата в слезной жидкости

Был проведен ряд независимых серий экспериментов со следующими образцами:

- растворы эналаприлата и СОД1;
- эналаприлат в суспензии СаР-частиц, покрытых 5 кДа хитозаном и 72 кДа гликоль-хитозаном;
- эналаприлат в суспензии 5 кДа хитозановых и гликоль-хитозановых частиц;
- СОД1 и эналаприлат в суспензии СаР-частиц, покрытых 5 кДа хитозаном

В экспериментах со свободными эналаприлатом или СОД1 или их смесью животным в каждый глаз однократно вводили 50 мкл 36 мкМ эналаприлата или 50 мкл 0,19 мг/мл СОД1 в 12,5 мМ фосфатном буфере. В экспериментах с частицами животным однократно

закапывали в оба глаза по 50 мкл суспензии частиц, содержащей равное количество эналаприлата или СОД1 или препаратов вместе.

В каждом эксперименте 18 кроликов случайным образом делили на шесть групп по 3 животных в каждой. Слезную жидкость собирали перед экспериментом, а затем через шесть различных интервалов времени от 5 до 300 минут после закапывания (в группе по 3 кролика - 6 глаз). Слезную жидкость собирали с помощью 6 круглых кусочков фильтровальной бумаги диаметром 5 мм, которые помещали в нижний конъюнктивный мешок каждого глаза на 5 мин. Затем фильтры помещали в пробирки типа Eppendorf с 300 мкл буфера А на 30 мин для элюирования компонентов слезы. Элюаты центрифугировали при 3000g в течение 10 мин, супернатанты использовали для определения препаратов. Остаточный эналаприлат в элюатах определяли по его способности ингибировать контрольную активность АПФ, определяемую по методике, описанной в пункте 2.2.9., а СОД1 по ингибированию реакции автоокисления кверцетина (п.2.2.10.)

2.3.2. Изучение влияния препаратов в растворе и в частицах на ВГД

Внутриглазное давление (ВГД) измеряли до закапывания препаратов и после него в течение 6-8 часов с интервалом в 1 час с помощью автоматического тонометра для ветеринарии «Tonovet» (Icare, Финляндия). Концентрация эналаприлата в растворе и в суспензии частиц составляла 2,2 мМ, СОД1 – 0,19 мг/мл. Растворы препаратов готовили в 12,5 мМ фосфатном буфере. Достоверность полученных результатов оценивали по U-критерию Манна-Уитни.

Эксперименты *in vivo* проводились в течение нескольких лет на различных партиях лабораторных животных. Этим мы объясняем различия, наблюдающиеся при исследованиях одинаковых образцов в экспериментах по снижению ВГД. Однако во всех экспериментах присутствовал контроль – свободный препарат в растворе. Благодаря этому сравнение результатов экспериментов *in vivo* становится более корректным.

Был проведен ряд независимых серий экспериментов по снижению ВГД со следующими образцами:

- А) раствор эналаприлата
- Б) раствор СОД1
- В) раствор обоих препаратов

Г) эналаприлат в составе суспензии непокрытых СаР-частиц, а также покрытых 5 кДа хитозаном и гликоль-хитозаном;

Д) эналаприлат в составе суспензии 5 кДа хитозановых и гликоль-хитозановых частиц;

Ж) СОД1 в составе суспензии СаР-частиц, покрытых 5 кДа хитозаном

З) совместно эналаприлат и СОД1 в составе суспензии СаР-частиц, покрытых 5 кДа хитозаном.

Проводили сравнение гипотензивного действия образца А с образцами Г и Д; также сравнивали действие образца Б и Ж на снижение ВГД, помимо этого сравнивали действие А, Б, В; и сравнивали действие образцов Г и З.

В экспериментах со свободными эналаприлатом или СОД1 или их смесью животным в каждый глаз однократно вводили 50 мкл раствора препаратов в 12,5 мМ фосфатном буфере. В экспериментах с частицами животным (на каждый образец группа 4 кролика – 8 глаз) однократно закапывали в оба глаза по 50 мкл суспензии частиц, содержащей равное количество эналаприлата или СОД1 или препаратов вместе. В каждом эксперименте в качестве контроля была группа интактных кроликов (3 кролика – 6 глаз), которым не закапывали препарат. Для каждого образца было проведено минимум три эксперимента по снижению ВГД.

2.3.2. Влияние СаР-частиц с эналаприлатом на восстановление увеального кровотока при ишемии глаза

Оценку восстановления увеального кровотока при индуцированной ишемии проводили при инстилляции эналаприлата как в составе СаР-частиц, покрытых хитозаном, так и в водной форме. В двух сериях экспериментов было задействовано 5 кроликов. Для создания экспериментальной модели ишемии глаза у кроликов применялся сосудосуживающий препарат Мезатон (фенилэфрин 10 мг/мл). В экспериментах каждому из 5 кроликов в один глаз закапывали раствор, содержащий частицы, а в другой – водную форму препарата за 30 минут до индуцирования ишемии, затем – сразу после индуцирования. Для проведения исследований использован метод количественной оценки степени ишемии с помощью офтальмоплетизмографии на приборе «Офтальмоплетизмограф» (СКТБ «Оптимед», Москва) [232]. Во время проведения этого исследования животные должны находиться в спокойном состоянии (низкая степень подвижности, стабильный пульс и артериальное давление) в течение нескольких часов. Для выполнения этого условия применяли препарат ветеринарного назначения с седативным и миорелаксантным действием - Ветранквил, 1%. Установку колпачков на роговицу проводили после местной анестезии глаз инстилляцией Инокаина.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Подбор условий получения пустых СаР-частиц

В обзоре литературы было отмечено, что существует несколько схожих методов получения СаР-частиц [53,84,103,106], используя которые можно получать частицы с размерами от 20 нм до нескольких мкм. Кроме того, от условий синтеза может зависеть фазовый состав частиц [233]. В ходе всей работы мы использовали метод получения СаР-частиц, следуя которому смешивание эквимольных растворов гидрофосфата калия и хлорида кальция мы проводили по ранее оптимизированной методике одновременно с ультразвуковым воздействием (п. 2.2.1.) [8]. Однако ранее получаемые частицы имели большой гидродинамический диаметр и широкое распределение по размерам. Помимо этого, они частично выпадали в осадок, что приводило к потере действующего вещества. Поскольку способность проникать через барьер роговицы зависит от размера частиц – чем он больше, тем хуже их проникновение во внутренние области глаза [234] – уменьшение размеров СаР-частиц может позволить добиться повышения эффективности проникновения препаратов через роговицу. Оптимальный размер частиц для доставки в ткани глаза составляет менее 500 нм, поскольку размер ячеек в стекловидном теле составляет 550 нм [57]. Первоначальной задачей стояло получение стабильных частиц с минимальным диаметром.

3.1.1. Влияние рН и температуры на характеристики образующихся СаР-частиц

Основными параметрами, влияющими на характеристики получаемых СаР-частиц, являются рН синтеза и температура [69]. Поэтому в рамках работы мы одновременно варьировали значение рН системы путем изменения рН раствора гидрофосфата калия и температуры синтеза.

В литературе имеются противоречивые сведения о влиянии температуры на размер осаждаемых СаР-частиц: показано как увеличение размера частиц при повышении температуры синтеза [53], так и уменьшение [235]. Помимо этого, при определении концентрации ионов Ca^{2+} и PO_4^{3-} в надосадочном растворе, оставшемся после центрифугирования, было замечено, что более высокая температура приводит к меньшему количеству остаточных ионов в оставшемся растворе, что указывает на более высокую эффективность осаждения [235].

Для изучения влияния температуры мы проводили синтез при фиксированной концентрации исходных солей с охлаждением льдом при фиксированном времени 20 минут

и мощности ультразвуковой обработки 200 Вт, при этом температура смеси увеличивалась до 20-23°C. Также проводили синтез без охлаждения при той же мощности и времени, при этом система разогревалась до 60-70°C. Охлаждение способствовало уменьшению стабильности частиц, образованию агрегатов и выпадению осадка при всех использованных нами значениях исходного раствора гидрофосфата калия (Табл. 8). Скорость кристаллообразования обуславливается двумя параметрами – скоростью зародышеобразования и скоростью роста кристаллов. Если скорость зародышеобразования выше, чем скорость роста кристаллов, это приводит к появлению в системе большого числа зародышей, у которых скорость роста невелика. В результате получается мелкокристаллический образец. Если же скорость роста кристаллов превышает скорость зародышеобразования, это приводит к образованию крупнокристаллического образца. Известно, что произведение растворимости фосфата кальция уменьшается с повышением температуры [236]. Предположительно, выпадение осадка во время синтеза при охлаждении обуславливалось относительно высоким произведением растворимости: зародышеобразование подавлялось ростом кристаллов, таким образом, получалось небольшое количество крупных частиц, которые выпадали в осадок.

Из литературы известно, что диаметр частиц и их распределение по размерам зависит от pH системы при синтезе: уменьшение pH фосфата от pH 7,5 до pH 5,7 приводило к образованию более крупных CaP-частиц с широким распределением по размерам от 220 нм до 830 нм [53]. Мы показали, что при дальнейшем увеличении значения pH в системе образовывались CaP-частицы меньшего гидродинамического диаметра, при этом распределение по размерам также было в более узком интервале (Табл. 8). По-видимому, это связано с тем, что при увеличении значения pH среды уменьшалась растворимость фосфата кальция, увеличивалась скорость зародышеобразования, и, тем самым, облегчался процесс осаждения соли [233].

Табл. 8. Зависимость размера пустых CaP-частиц от значения pH исходного раствора гидрофосфата калия и температуры синтеза (время ультразвуковой обработки – 20 минут, мощность 200 Вт, концентрация цитрата натрия 15,6 мМ).

Условия	t _{нач} , °C	t _{кон} , °C	d, нм/PDI					
			pH 7,0		pH 7,5		pH 8,8	
Без охлаждения	23	60-70	350±35	0,51	230±20	0,49	80±20	0,19
Лед+вода	4	20-23	>1000	0,63	>1000	0,72	>1000	-

Таким образом, увеличение значения рН системы и увеличение температуры синтеза позволило уменьшить размер частиц до 80 нм и добиться узкого распределения частиц по размерам (Рис. 10). Конечное значение рН системы после синтеза составляло 7,5.

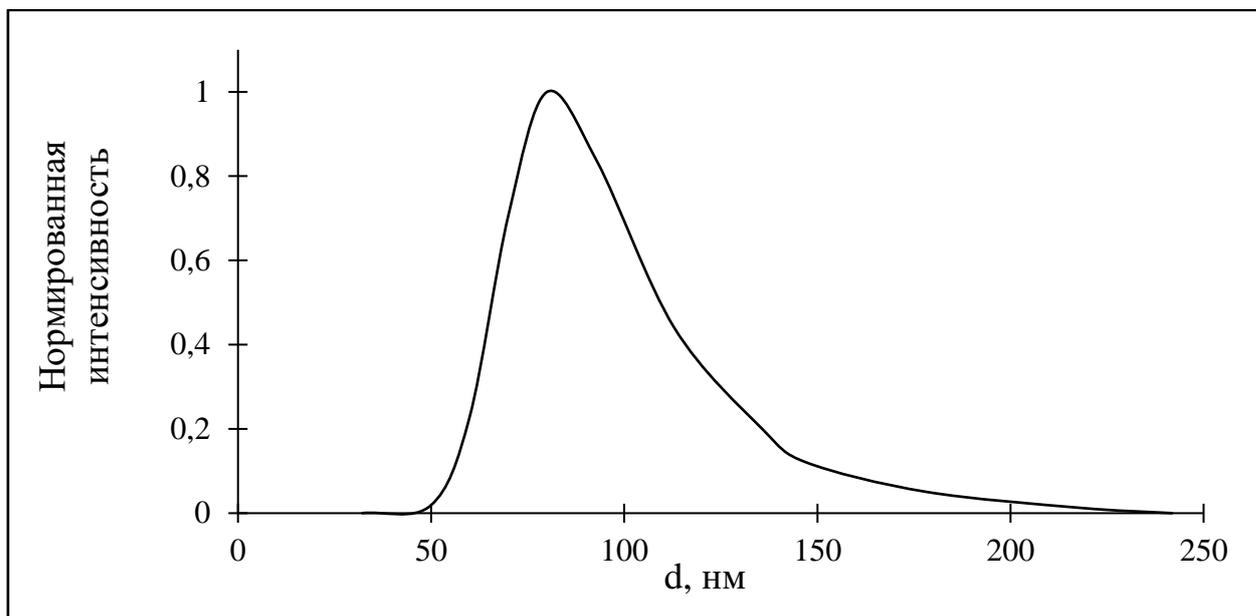


Рис. 10. Распределение пустых СаР-частиц по размерам (рН раствора гидрофосфата калия 8,8; концентрация цитрата натрия 15,6 мМ; без охлаждения, обработка ультразвуком в течение 20 минут). Данные получены методом ДСР.

3.1.2. Влияние концентрации стабилизирующего агента на характеристики СаР-частиц, полученных без охлаждения

Известно, что цитрат натрия является стабилизирующим агентом при синтезе СаР-частиц и препятствует коагуляции суспензии на стадии образования и хранения частиц. Цитрат формирует заряженный слой вокруг частиц и способствует повышению их устойчивости за счет электростатического отталкивания [103]. Для подбора оптимальной концентрации цитрата натрия была проведена серия экспериментов при варьировании его начальной концентрации в диапазоне от 0 до 78,0 мМ (Табл. 9). Частицы были получены при рН исходного раствора гидрофосфата калия 8,8 без охлаждения при мощности ультразвука 200 Вт. Установлено, что при низких концентрациях цитрата натрия частицы образовывали агломераты и выпадали в осадок (Табл. 9). При повышении концентрации цитрата происходило уменьшение размера частиц, а затем, начиная с 15,6 мМ, их диаметр оставался примерно постоянным. При этом увеличение концентрации цитрата практически не влияло на значение ζ -потенциала частиц (Табл. 9).

Табл. 9. Характеристики CaP-частиц, полученных при варьировании исходной концентрации цитрата натрия. (рН раствора гидрофосфата калия 8,8; без охлаждения, обработка ультразвуком в течение 20 минут. Цветом выделены характеристики частиц с оптимальными параметрами

С(цитрата), мМ	d, нм	ζ-потенциал, мВ
0	>1000+осадок	—
3,1	>1000+осадок	—
7,8	210±20	-25±2
15,6	80±20	-25±3
31,2	90±20	-25±3
46,8	100±20	-24±2
78,0	120±10	-25±3

По совокупности параметров в качестве оптимальной концентрации стабилизирующего агента была выбрана концентрация 15,6 мМ цитрата натрия, так как при меньшем его содержании частицы агрегировали, а увеличение концентрации свыше 15,6 мМ не влияло на характеристики частиц.

3.1.3. Совместное влияние концентрации цитрата натрия и рН на характеристики частиц, полученных при охлаждении

При охлаждении реакционной смеси во время синтеза в присутствии 15,6 мМ цитрата полученные частицы выпадали в осадок. При этом, ультразвуковое воздействие при синтезе частиц без охлаждения приводило к разогреву системы до 60-70°C. Поскольку в работе в качестве включаемого препарата использовался фермент супероксиддисмутаза 1, попытка его включения в CaP-частицы при повышенной температуре могла привести к инактивации фермента. Поэтому предприняли попытку получить CaP-частицы при низкой температуре, увеличив концентрацию стабилизирующего агента цитрата натрия, данные представлены в таблице 10. Синтез при охлаждении проводили при двух значениях рН.

Табл. 10. Влияние концентрации стабилизирующего агента цитрата натрия на характеристики пустых CaP-частиц при охлаждении.

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

Как видно из табл. 10, двух- и трехкратное увеличение концентрации цитрата натрия привело к значительному уменьшению гидродинамического диаметра частиц и их стабилизации, поскольку после их синтеза не наблюдалось выпадение осадка. В отличие от синтеза частиц без охлаждения, гидродинамический диаметр частиц, полученных при повышенной концентрации цитрата, имел обратную зависимость от рН: в данном случае при увеличении рН увеличивался гидродинамический диаметр частиц, что коррелирует с ранее полученными данными [53].

Таким образом, нам удалось получить частицы с необходимыми характеристиками при охлаждении, за счет увеличения концентрации стабилизирующего агента. Для работы были выбраны условия – рН раствора гидрофосфата калия 7,0 и начальная концентрация цитрата натрия 46,8 мМ. Конечное значение рН системы после синтеза составляло 6,8.

3.1.4. Влияние мощности ультразвукового воздействия на характеристики CaP-частиц

При синтезе CaP-частиц мы использовали ультразвуковую обработку, которая является эффективным методом диспергирования наноматериалов в процессе их синтеза. Известно, что варьирование мощности ультразвукового воздействия позволяет влиять на характеристики получаемых материалов или носителей из различных материалов [237], поэтому было необходимо изучить влияние мощности ультразвука на характеристики получаемых CaP-частиц (Табл.11). Установлено, что при низкой мощности ультразвукового воздействия частицы образовывали агломераты и выпадали в осадок (Табл. 11). При повышении мощности ультразвуковой обработки происходило монотонное уменьшение размера частиц вплоть до 80 нм при 200 Вт – максимально возможной мощности для данной модели соникатора. Явного влияния мощности ультразвуковой обработки на ζ-потенциал стабильных частиц обнаружено не было (Табл. 11).

Таблица 11 Характеристики CaP-частиц, полученных при варьировании мощности ультразвукового воздействия (рН раствора гидрофосфата калия 8,8; концентрация цитрата натрия 15,6 мМ; без охлаждения, обработка ультразвуком в течение 20 минут).

Мощность, Вт	d, нм	ζ-потенциал, мВ
40	390±70*	—
60	300±40	-25±1
80	170±10	-25±2
120	120±10	-25±1
160	100±10	-25±3
200	80±20	-25±1

*Измерено в надосадочной жидкости

В итоге для дальнейшей работы была выбрана мощность 200 Вт, так как это значение позволило получить частицы наименьшего размера.

3.1.5. Влияние времени обработки ультразвуком на характеристики частиц

Поскольку при понижении мощности ультразвукового воздействия частицы увеличивались в размерах (Табл. 11), мы проверили, не могло ли увеличение времени обработки ультразвуком привести к уменьшению размера частиц. Были выбраны два значения мощности – 80 Вт и 120 Вт, для которых получались частицы со средним гидродинамическим диаметром от 120 до 170 нм, не выпадавшие в осадок. При данных мощностях был проведён синтез со временем обработки ультразвуком 30 минут (Табл. 12).

Таблица 12. Характеристики частиц, полученных при разном времени ультразвуковой обработки без охлаждения.

Время, мин	Мощность 80 Вт		Мощность 120 Вт		Мощность 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

Установлено, что при увеличении времени обработки ультразвуком получают частицы фосфата кальция меньшего диаметра. При этом для высокой мощности (200 Вт)

размер частиц был одинаков при озвучивании в течение 20 и 30 минут. Зависимости ζ -потенциала от времени ультразвукового воздействия не было обнаружено. Таким образом, если не доступен соникатор с мощностью 200 Вт, можно использовать более низкие мощности, однако увеличивая время воздействия ультразвука.

Мы показали, что при применении мощности ультразвука 200 Вт можно использовать время ультразвуковой обработки 20 минут с сохранением характеристик получаемых частиц (Табл. 12). Однако уменьшение времени ультразвуковой обработки до 10 мин приводило к образованию крупных агломератов размером более 1000 нм (Табл. 12.) Основываясь на этих данных, все частицы для дальнейшей работы были получены при обработке ультразвуком в течение 20 минут.

3.1.6. Зависимость характеристик CaP-частиц от диаметра емкости и времени при обработке ультразвуком

Ввиду того, что ультразвуковое воздействие производится с помощью иглы соникатора, погруженной в реакционную смесь, могут существовать, во-первых, диффузионные затруднения при перемещении ионов солей и образующихся частиц от периферийной части раствора к игле, и во-вторых, ультразвуковые волны могут затухать при удалении от источника. Таким образом, при увеличении диаметра емкости образуются частицы большего размера с большей полидисперсностью (Табл. 13). Негативное влияние увеличения диаметра емкости можно уменьшить, увеличив время ультразвукового действия (Табл. 13).

Таблица 13. Зависимость характеристик CaP-частиц от диаметра емкости для ультразвуковой обработки. (рН раствора гидрофосфата калия 8,8; концентрация цитрата натрия 15,6 мМ; без охлаждения, обработка ультразвуком в течение 20 минут). *d(0,45) – гидродинамический диаметр частиц после фильтрования через фильтр 0,45 мкм.

Диаметр емкости, мм	Время обработки, мин	d, нм	PDI	d(0,45)*, нм	PDI	ζ , мВ
20	20	90±5	0,15	90±5	0,11	-25±1
25	10	1100±400	0,9	-	-	-
25	20	80±20	0,19	80±5	0,16	-25±2
25	30	90±10	0,16	95±5	0,13	-25±2
40	20	230±20	0,37	110±10	0,15	-21±2
40	30	95±10	0,3	95±5	0,11	-25±3

В результате изучения влияния условий на характеристики СаР-частиц были выбраны два оптимальных метода синтеза частиц (Табл. 14). СаР-частицы по методике А получали при рН раствора гидрофосфата калия 8,8, концентрации цитрата натрия 15,6 мМ, без охлаждения; а по методике Б – при рН раствора гидрофосфата калия 7,0, концентрации цитрата натрия 46,8 мМ, с охлаждением

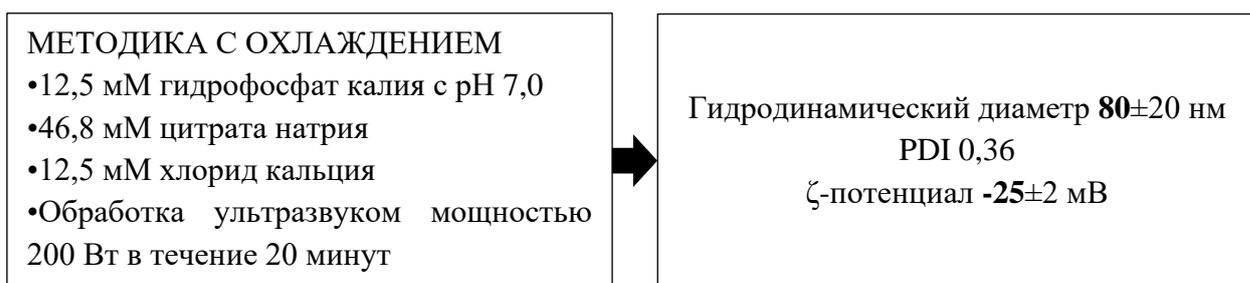
Табл. 14. Условия синтеза СаР-частиц и их характеристики

Методика	d, нм	PDI	ζ, мВ	pH(K ₂ HPO ₄)	C(цитрата), мМ	t°C
А	80±20	0,19	-25±2	8,8	15,6	60-70°C
Б	80±20	0,36	-23±4	7,0	46,8	20-30°C

Для удобства восприятия представим методики А и Б в виде схемы синтеза и результирующих характеристик частиц (8):



(8)



3.2. Характеристики пустых СаР-частиц

3.2.1. Фазовый состав СаР-частиц

Анализ рентгеновской дифрактограммы пустых СаР-частиц, полученных по методике А, показал, что частицы в основном представляют собой гексагональную модификацию гидроксиапатита (Рис. 11) и аморфную фазу, что можно было определить по уширению пиков, соответствующих кристаллической фазе - гидроксиапатиту.

(8)

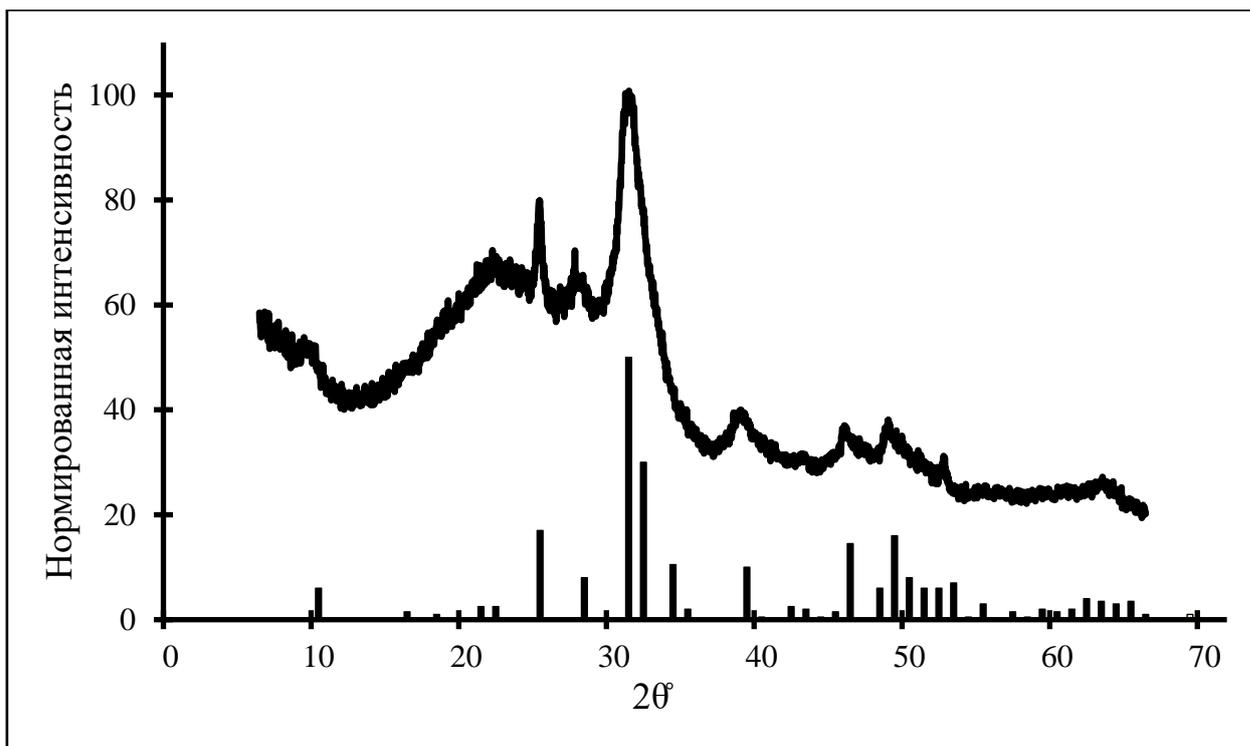


Рис. 11. Дифрактограмма пустых СаР-частиц, полученных по методике без охлаждения. Линии представляют теоретический спектр для гексагональной модификации гидроксиапатита.

В ряде работ по получению СаР-частиц основной фазой является гидроксиапатит [72,73,78,238,239]. Полученные данные по фазовому составу соответствуют литературным данным, поскольку основными требованиями по получению гидроксиапатита из раствора являются щелочная среда и повышенная температура [69,80,82].

3.2.2. Морфология СаР-частиц

Для более подробного изучения структуры и морфологии частиц, образцы СаР-частиц, полученные по методикам А и Б, были исследованы методами проникающей электронной микроскопии (ПЭМ) и растровой электронной микроскопии (РЭМ). Снимки приведены на рис. 12. Для СаР-частиц, полученных по методике Б, были получены снимки методом РЭМ, так как из-за более высокоэнергетического электронного пучка при проведении анализа методом ПЭМ происходила деструкция образцов.

Для сравнения в табл. 14 представлены данные по гидродинамическому диаметру и распределению по размерам по ДСР различных образцов СаР-частиц. ПЭМ-изображения СаР-частиц, полученных по методике А, продемонстрировали, что частицы имели удлиненную «стержневую» структуру, кроме того, наблюдались более мелкие округлые частицы (рис. 12А). Размер СаР-частиц, определенный с помощью ПЭМ (30-150 нм),

соответствовал среднему гидродинамическому диаметру, определенному с помощью ДСР (Табл. 14).

На изображении РЭМ СаР-частиц, полученных по методике Б, видно множество частиц округлой формы размером до 100 нм (Рис.12Б), что согласуется с данными ДСР (Табл. 14, Схема 8). Помимо этого, на снимке также видны агломераты, которые образовались при высушивании образца на матрице. По-видимому, различия в форме СаР-частиц, полученных в разных условиях, были связаны с фазовым составом образцов: вытянутую форму имели СаР-частицы (Рис. 12А), полученные по методике А и обладавшие кристаллической структурой гидроксиапатита [80,239], а частицы, обладавшие округлой формой (Рис. 12А), могли соответствовать аморфной фазе фосфата кальция [84,88]. Аморфизация образцов, полученных по методике Б, могла быть связана с увеличением концентрации стабилизирующего агента цитрата натрия в 3 раза, с понижением температуры синтеза, а также с более низким рН среды при получении.

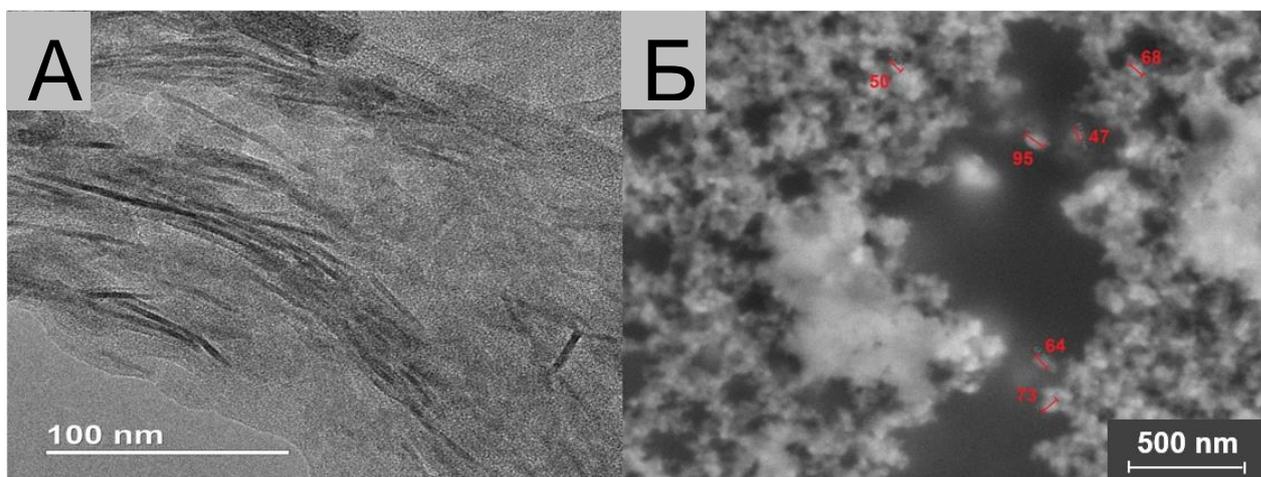


Рис. 12. Снимки СаР-частиц: А) синтезированных по методике А (ПЭМ), Б) синтезированных по методике Б (РЭМ).

3.2.3. Определение площади поверхности СаР-частиц

Площадь поверхности СаР-частиц, полученных по методике А, изучали методом низкотемпературной адсорбции азота. Площадь поверхности непокрытых СаР-частиц составляла 185 м²/г. Считается, что материал с площадью поверхности >200 м²/г соответствует образцу с высокоразвитой поверхностью. Размер пор частиц составлял 13±2 нм. Образец являлся мезопористым, так как присутствовала петля гистерезиса сорбции-десорбции азота, и размер пор лежал в пределах 2-50 нм (Рис. 13А, Б). Вид изотермы соответствовал типу IV по классификации ИЮПАК с петлей гистерезиса, типичной для

материалов с разными размерами мезопор, о чем свидетельствовал широкий диапазон распределения размеров пор [229].

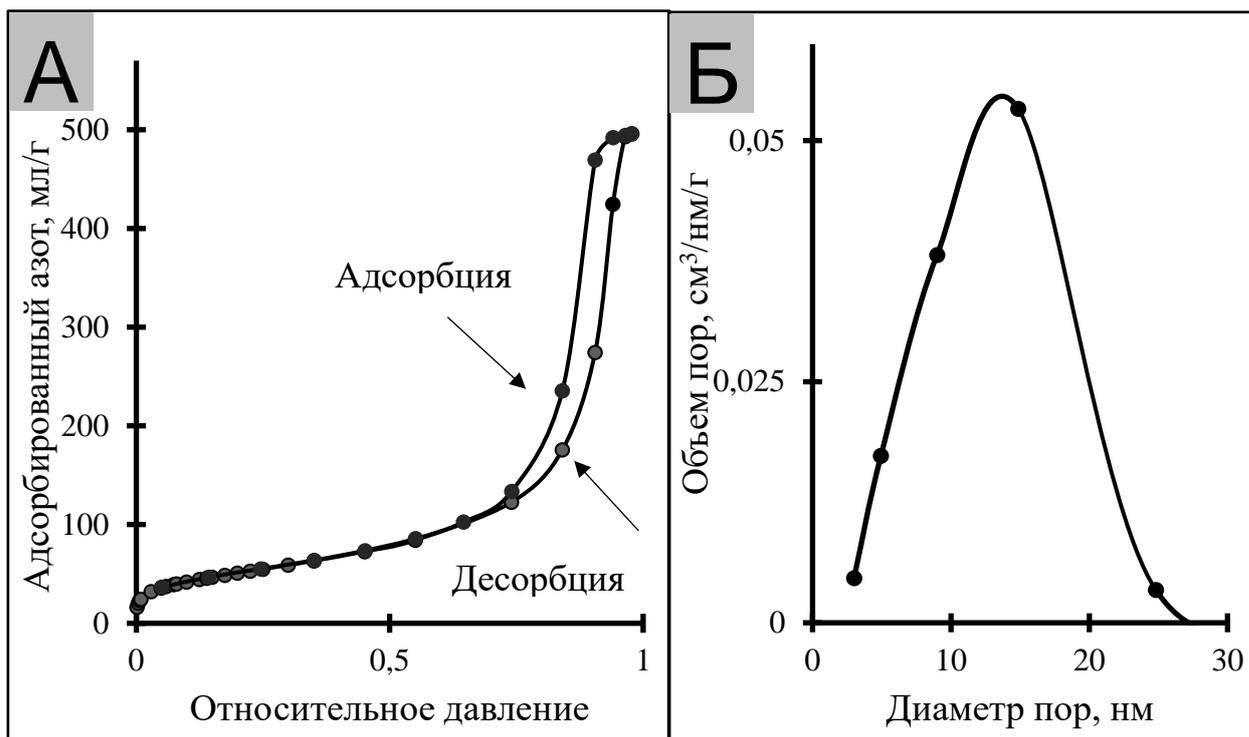


Рис. 13 А) Изотерма адсорбции азота на СаР-частицах, Б) Распределение объема пор по размерам.

3.3. Подбор условий покрытия СаР-частиц хитозанами двух видов

3.3.1. Используемые в работе виды хитозана

Как известно из обзора литературы, и клетки роговицы, и СаР-частицы обладают отрицательным зарядом, поэтому проникновение лекарственных препаратов во внутренние области глаза может быть затруднено [130]. Для улучшения проникновения необходимо модифицировать частицы таким образом, чтобы конечные частицы обладали нейтральным или положительным зарядом. К тому же, увеличение значения поверхностного заряда частиц может повысить их стабильность к агрегации.

Для решения этой задачи мы использовали покрытие положительно заряженным полисахаридом хитозаном, позволяющим изменить заряд поверхности СаР-частиц с отрицательного на положительный [10]. Помимо этого, мукоадгезивность хитозана способна повысить эффективность взаимодействия частиц с роговицей [133].

С другой стороны, применение хитозана имеет существенные ограничения: известно, что он растворим только при низких значениях рН [132,141]. Однако введение в

организм растворов с низким значением pH может вызвать болезненные ощущения или местное раздражение. Другая проблема – носители на основе хитозана, попадая в среды с физиологическими значениями pH, могут выпадать в осадок. Для использования хитозана при более высоких pH можно использовать хитозан в форме солей или производные хитозана [130,141,174].

Вследствие этого нами были выбраны два вида хитозана, обладающие способностью растворяться в нейтральной среде: низкомолекулярный хитозан со средней молекулярной массой 5 кДа в форме лактата, а также гликоль-хитозан со средней молекулярной массой 72 кДа (Рис. 14).

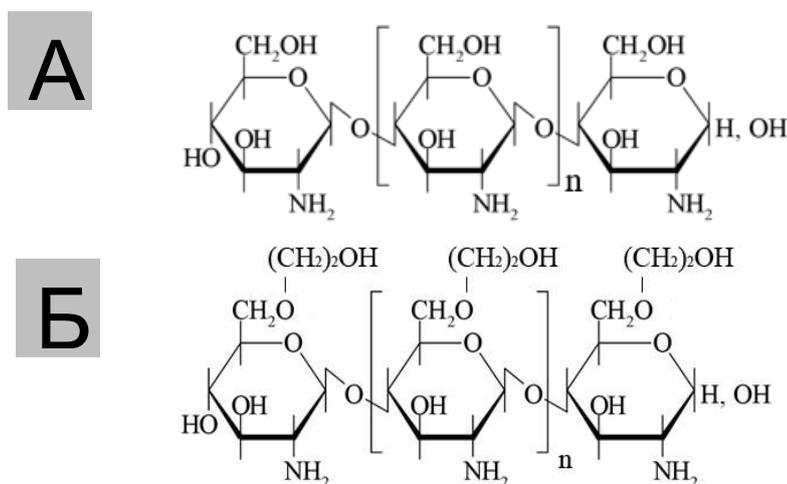


Рис. 14. Структуры 5 кДа хитозана (А), 72 кДа гликоль-хитозана (Б).

Основываясь на данных по молекулярной массе и степени деацетилирования, мы произвели расчет числа звеньев в молекулах хитозанов, использованных в работе. Для 5 кДа хитозана в среднем на 1 молекулу приходилось 28 звеньев, из которых по крайней мере 25 деацетилированы; в случае гликоль-хитозана – в молекуле 300 звеньев, из которых более 182 не несли ацетильной группы.

Покрывание CaP-частиц хитозаном производили методом ионотропного гелеобразования. В качестве сшивающего агента использовали триполифосфат натрия (ТПФ), который образует ионные мостики между положительно заряженными группами хитозана, а также нетоксичен и способен к мгновенному гелеобразованию при контакте с хитозаном [240].

Для подбора условий покрытия мы одновременно варьировали ряд параметров: pH среды, концентрацию хитозана, соотношение ТПФ:хитозан. Для представления результатов мы рассмотрим влияние этих параметров на эффективность покрытия по

отдельности. Подбор условий осуществляли с использованием СаР-частиц, полученных по методике А (Табл. 14).

Критерием выбора условий была оценка изменения размера частиц и ζ -потенциала при покрытии: сдвиг ζ -потенциала в положительную область свидетельствовал о покрытии СаР-частиц, причем величина сдвига являлась характеристикой степени покрытия. Однако наличие в системе положительно заряженных частиц могло также являться свидетельством образования просто хитозановых частиц. Поэтому было необходимо определить, образуются ли хитозановые частицы в исследуемых условиях. Для этого вместо суспензии СаР-частиц использовали раствор, содержащий 12,5 мМ гидрофосфата калия и 15,6 мМ цитрата натрия (то есть не содержащий солей кальция) и доведенный до необходимого значения рН, к которому вносили хитозан и ТПФ. Также оценивали коэффициент полидисперсности распределения частиц по размеру. Низкий коэффициент полидисперсности ($PDI < 0,3$) свидетельствовал о получении частиц с узким распределением по размерам.

3.3.2. Подбор рН системы при покрытии

А) Подбор рН системы при покрытии СаР-частиц 5 кДа хитозаном

Для подбора рН всей системы при покрытии СаР-частиц 5 кДа хитозаном изучали характеристики частиц при различных значениях рН системы, равных 5,3; 5,7; 6,0. Представленные ниже данные получены при концентрации хитозана 1 мг/мл и соотношении ТПФ:хитозан=0,2:1.

При проведении экспериментов по подбору рН покрытия руководствовались зависимостью растворимости хитозана от рН: было обнаружено, что при приготовлении раствора 5 кДа хитозана с рН выше 6,0, происходило выпадение осадка хитозана. С другой стороны, с понижением рН повышалась растворимость фосфата кальция. Таким образом, мы рассматривали диапазон значения рН системы от 5,0 до 6,0.

При попытке покрытия СаР-частиц 5 кДа хитозаном при рН 5,3 оказалось, что размер частиц был меньше, чем исходных (Табл. 14, 16). По-видимому, в данных условиях исходные СаР-частицы частично растворялись. Кроме того, не исключено, что в этих условиях образовывались хитозановые частицы, которые мы наблюдали в отсутствие соли кальция. На это указывало широкое распределение по размерам (PDI), а также высокое положительное значение ζ -потенциала (Табл. 15).

Таблица 15. Подбор рН системы для покрытия 5 кДа хитозаном.

рН	СаР-частицы/5 кДа хитозан			Хитозановые частицы	
	d, нм	PDI	ζ, мВ	d, нм	ζ, мВ
5,3	50±20	0,69	+16±1	15±10	+22±1
5,7	160±25	0,21	+11±2	30±5	+23±2
6,0	170±30	0,94	-25±1, +24±2	15±10	+24±1

При рН 6,0 на графике распределения частиц по размеру явно видны две фракции (Рис. 15А). При определении ζ-потенциала также наблюдались два пика (Табл. 15), соответствующие непокрытым СаР-частицам (-25 мВ) и хитозановым частицам (+24 мВ) (Табл. 14, 15). По-видимому, при данных условиях СаР-частицы оставались практически непокрытыми, но одновременно в системе происходило образование хитозановых частиц. Помимо этого, происходило выпадение осадка 5 кДа хитозана.

При рН 5,7 происходило покрытие СаР-частиц без образования хитозановых, о чём свидетельствовал низкий коэффициент полидисперности. Происходил сильный сдвиг ζ-потенциала в положительную область и увеличение размера частиц с 80 нм до 160 нм (Табл. 8), при этом, ζ-потенциал частиц, определенный в условиях покрытия, был значительно ниже, чем у хитозановых, что могло быть связано с отрицательным ζ-потенциалом непокрытых СаР-частиц. В отсутствие СаР-частиц в растворе гидрофосфата калия также образовывались хитозановые частицы (Табл. 15), однако пика, соответствующего их размеру, на графике распределения по размеру покрытых хитозаном СаР-частиц не наблюдалось (Рис. 15Б). Из этого можно сделать вывод о том, что при данном значении рН хитозан покрывал СаР-частицы, а не образовывал собственные частицы. Однако при рН 5,7 5 кДа хитозан частично выпадал в осадок.

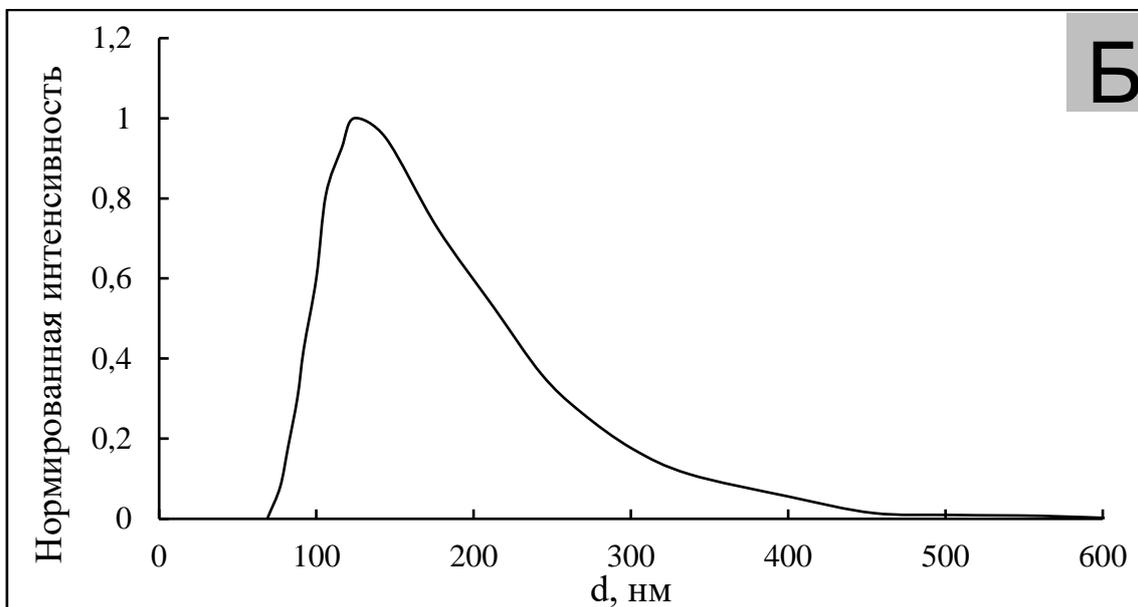
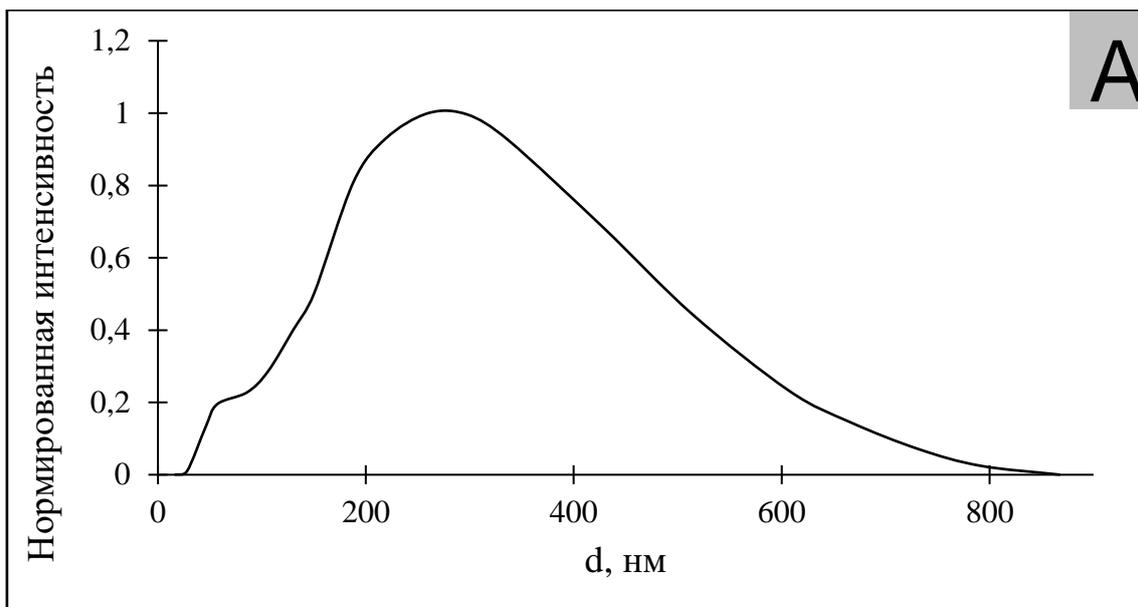


Рис. 15. Распределение по размерам CaP-частиц, покрытых 5 кДа хитозаном и полученных при А) pH 6,0; Б) при pH 5,7. Данные получены методом ДСР.

В результате было подобрано значение pH системы для эффективного покрытия CaP-частиц 5 кДа хитозаном, а именно 5,7.

Б) Подбор pH системы при покрытии CaP-частиц гликоль-хитозаном

Для подбора pH системы при покрытии CaP-частиц гликоль-хитозаном изучали характеристики частиц при различных значениях pH системы, содержащей исходные CaP-частицы, гликоль-хитозан и ТПФ, равных 5,7; 6,8; 7,2. Гликоль-хитозан с молекулярной массой 72 кДа, в отличие от 5 кДа хитозана, имеет более широкие пределы растворимости: растворы гликоль-хитозана устойчивы вплоть до pH 7,5; поэтому в данном случае диапазон

значений рН системы был расширен до 7,2. Представленные ниже данные получены при концентрации хитозана 1 мг/мл, концентрации ТПФ 1 мг/мл и соотношении ТПФ:хитозан=0,2:1.

При покрытии гликоль-хитозаном СаР-частиц при рН 5,7 и 7,2 полученные частицы имели более низкий ζ -потенциал по сравнению с частицами, полученными при рН 6,8 (Табл. 16), что, по-видимому, связано с более эффективным покрытием СаР-частиц гликоль-хитозаном при рН системы 6,8. Несмотря на то, что в отсутствие соли кальция наблюдалось образование хитозановых частиц, в суспензии при рН 6,8 происходило исключительно покрытие гликоль-хитозаном СаР-частиц, так как на графике распределения частиц по размерам присутствовал только один пик (Рис. 16), а коэффициент полидисперсности имел низкое значение.

Табл. 16. Подбор рН системы для покрытия СаР-частиц гликоль-хитозаном.

рН	СаР-частицы/Гликоль-хитозан			Хитозановые частицы	
	d, нм	PDI	ζ , мВ	d, нм	ζ , мВ
5,7	80±5	0,61	+10±1	30±5	+16±4
6,8	240±10	0,25	+20±3	30±10	+15±1
7,2	185±10	0,37	+8±1	130±30	+23±1

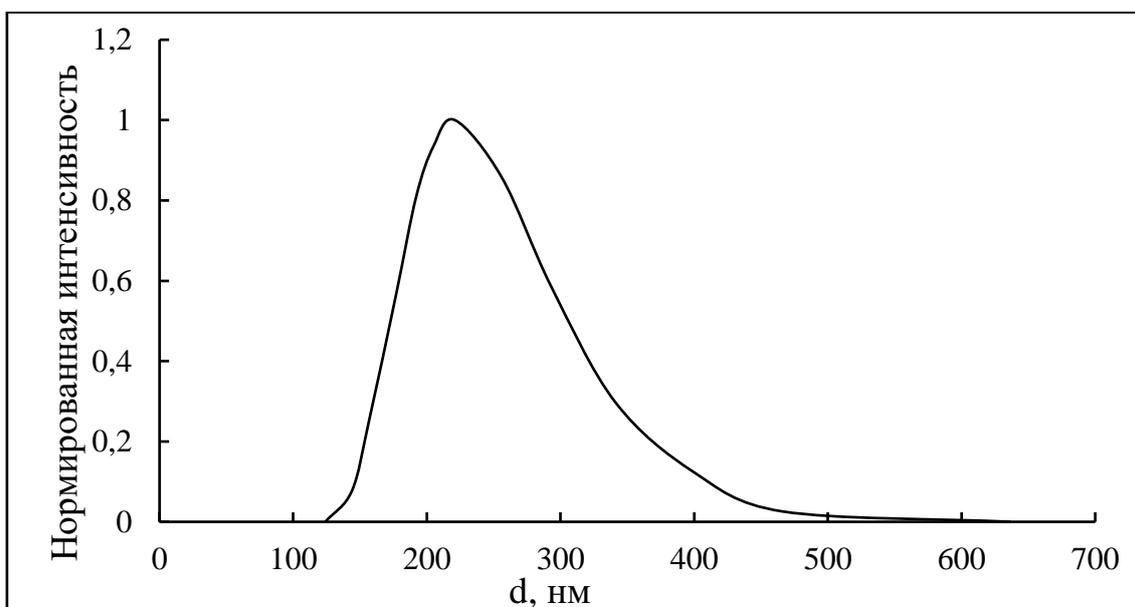


Рис 16. Распределение по размерам СаР-частиц, покрытых гликоль-хитозаном при рН 6,8. Данные получены методом ДСР.

Таким образом, для покрытия СаР-частиц 5 кДа хитозаном был выбран рН 5,7, а гликоль-хитозаном – рН 6,8, при которых происходило эффективное покрытие СаР-частиц, о чем свидетельствует увеличение размера частиц и изменение заряда поверхности в положительную область (Табл. 15, 16). При этом образования в выбранных условиях хитозановых частиц в присутствии СаР-частиц не наблюдалось.

3.3.3. Подбор соотношения ТПФ:хитозан

Известно, что оптимальные условия покрытия зависят от характеристик хитозана: степени деацетилирования и молекулярной массы. А также показано, что покрытие частиц обычно происходит при использовании узкой области массовых соотношений ТПФ и хитозана между 0,15:1 и 0,25:1. При меньшем количестве ТПФ степень покрытия частиц была низкой, а при использовании близких концентраций хитозана и вспомогательного агента наблюдалась агрегация частиц [54,161]. Кроме того, увеличение соотношения ТПФ:хитозан могло привести к падению ζ -потенциала из-за экранирования свободных аминогрупп хитозана [241].

Так как в данной работе мы использовали низкомолекулярный хитозан со средней молекулярной массой 5 кДа и гликоль-хитозан с молекулярной массой 72 кДа, оптимальные условия покрытия могли существенно отличаться. Таким образом, было необходимо подобрать оптимальные условия для покрытия частиц хитозаном обоих видов. Для этого мы проварьировали различные объёмные соотношения хитозана и ТПФ при фиксированной концентрации ТПФ, а также концентрацию хитозана (Табл. 17, 18).

В случае 5 кДа хитозана при понижении его исходной концентрации до 0,5 мг/мл покрытие происходило в малой степени, так как ζ -потенциал частиц оставался отрицательным (Табл. 17), хотя и несколько повышал своё значение по сравнению с СаР-частицами с -25 мВ до -8 мВ. По-видимому, этого количества хитозана недостаточно для покрытия частиц. При использовании низкого соотношения ТПФ:хитозан, степень покрытия СаР-частиц также была мала, на что указывал слабый сдвиг ζ -потенциала в положительную область (Табл. 17). Частицами с наиболее подходящими характеристиками оказались частицы, полученные при соотношении ТПФ:хитозан=0,2:1, так как они обладали наибольшим значением ζ -потенциала. Дальнейшее увеличение соотношения ТПФ:хитозан привело к получению крупных агрегатов, обладавших меньшим ζ -потенциалом. Возможно, это связано с тем, что при увеличении концентрации ТПФ происходило экранирование положительно заряженных аминогрупп хитозана, что

приводило к более слабому возрастанию ζ -потенциала по сравнению с частицами, покрытыми при более низких соотношениях ТПФ:хитозан.

Табл. 17. Подбор соотношения ТПФ:хитозан при покрытии СаР-частиц 5 кДа хитозаном.

с(хитозан), мг/мл	ТПФ:хитозан	d, нм	ζ , мВ	Отношение NH ₂ /ТПФ
0,5	0,2:1	120±30	-8±1	4,5
1	0,1:1	80±15	+5±1	18,5
1	0,15:1	115±25	+10±1	12,5
1	0,2:1	160±25	+12±2	9
1	0,25:1	390±40	+7±2	7,5
1	1:1	600±50	+8±2	2

Для гликоль-хитозана зависимость характеристик покрытых СаР-частиц от соотношения ТПФ:хитозан подчинялась тем же закономерностям, что для частиц, покрытых 5 кДа хитозаном (Табл. 18). При низких соотношениях ТПФ:хитозан степень покрытия была недостаточной, так как ζ -потенциал был меньше максимальной величины, полученной при использовании соотношения ТПФ:хитозан=0,2:1. При дальнейшем увеличении соотношения ТПФ:хитозан, а также при использовании более высокой концентрации хитозана – 2 мг/мл, образовывались агрегаты частиц свыше 1000 нм, ζ -потенциал которых не определялся. Образование схожих агрегатов свыше 1000 нм ранее наблюдалось при покрытии СаР-частиц хитозаном молекулярной массой 89 кДа [54].

Табл. 18. Подбор соотношения ТПФ:хитозан при покрытии СаР-частиц гликоль-хитозаном.

с(хитозан), мг/мл	ТПФ:хитозан	d, нм	ζ , мВ	Отношение NH ₂ /P
1	0,1:1	80±15	+9±2	9,5
1	0,15:1	90±10	+16±5	6
1	0,2:1	240±10	+20±2	4,5
1	0,25:1	>1000	-	3,5
1	1:1	>1000	-	1
2	0,2:1	>1000	-	9,5

Интересно отметить, что соотношение азота аминогруппы хитозана и фосфора триполифосфата при оптимальных условиях покрытия отличается в два раза: 1,8 и 0,9 для 5 кДа хитозана и гликоль-хитозана соответственно. По-видимому, это связано с процентом деацетилирования хитозанов, он составляет около 90% для 5 кДа хитозана и около 60% - для гликоль-хитозана. Поскольку у 5 кДа хитозана больше свободных аминогрупп, требуется большее число молекул ТПФ для их связывания.

Итак, способность хитозана образовывать покрытие на поверхности СаР-частиц очень зависит от концентрации самого хитозана и сшивающего агента в растворе. Соотношение ТПФ:хитозан=0,2:1 было выбрано нами в качестве оптимального для обоих видов хитозана, так как в данном случае получались частицы с положительным ζ -потенциалом, что свидетельствует о покрытии СаР-частиц хитозаном (Табл. 18,19).

3.4. Характеристики СаР-частиц, покрытых хитозаном

СаР-частицы, полученные в разных условиях по методикам А и Б (раздел 3.1.), характеризовались примерно схожим диаметром и ζ -потенциалом, однако индекс полидисперсности в случае частиц, синтезированных при охлаждении и более высокой концентрации цитрата, был в 2,25 раз выше, что свидетельствует о более широком распределении частиц по размерам (Табл. 14, 19). Однако при покрытии СаР-частиц 5 кДа хитозаном, полученных по методикам А и Б, достоверного отличия характеристик полученных частиц не наблюдалось.

Табл. 19. Характеристики СаР-частиц, полученных в различных условиях синтеза.

Частицы	d, нм	PDI	ζ , мВ
СаР (Методика А)	80±20	0,19	-25±1
СаР (Методика Б)	80±20	0,36	-23±4
СаР (Методика А)/5 кДа	160±25	0,21	+12±2
СаР (Методика Б)/5 кДа	155±25	0,16	+16±3
СаР(Методика А)/ Гликоль-хитозан	240±20	0,25	+20±3

В случае гликоль-хитозана для покрытия использовали частицы, полученные по методике А. Для них наблюдался более сильный сдвиг ζ -потенциала в положительную

область (Табл. 19), поскольку гликоль-хитозан имеет большую молекулярную массу, чем 5 кДа хитозан, а, соответственно, и больше аминогрупп, не экранированных ТПФ при покрытии. Размер покрытых гликоль-хитозаном частиц был больше, чем покрытых низкомолекулярным хитозаном, что, по-видимому, также связано с размером самого хитозана.

Также была определена концентрация непокрытых и покрытых хитозанами СаР-частиц путем лиофильного высушивания очищенных диализом против деионизованной воды образцов. Концентрация частиц во всех образцах составляла примерно 1 мг/мл.

3.4.1. Фазовый состав покрытых хитозанами СаР-частиц

Исследование фазового состава покрытых хитозаном СаР-частиц методом РФА (Рис. 17А, Б) показало, что образцы состояли из гексагонального гидроксиапатита и аморфного фосфата кальция.

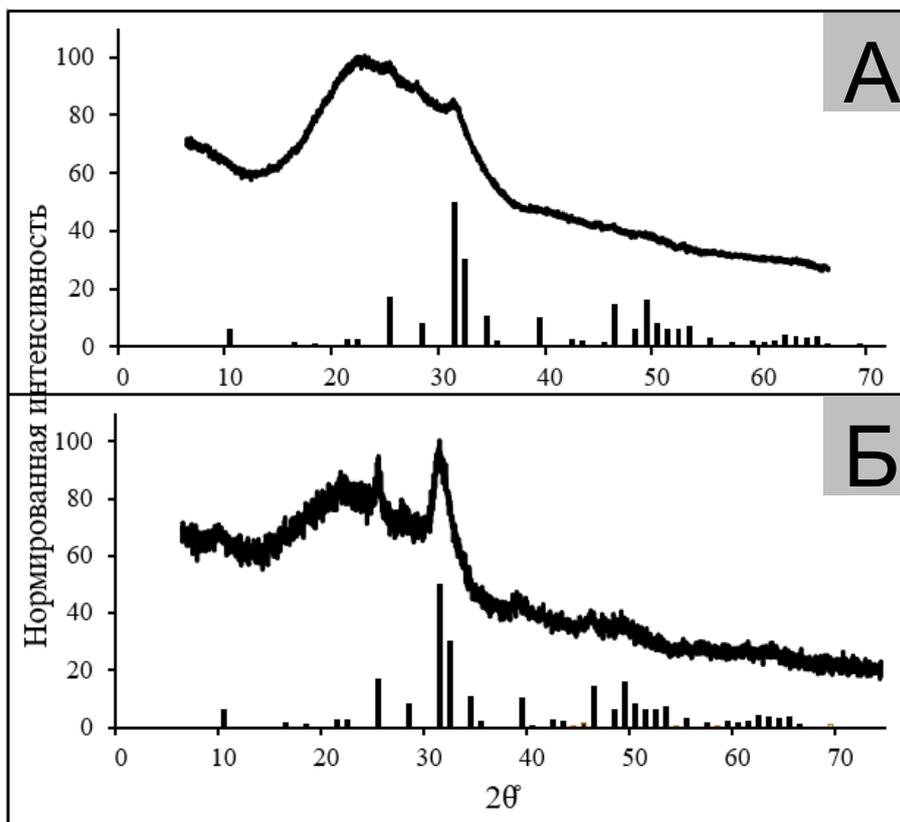


Рис. 17. Дифрактограммы пустых покрытых хитозаном СаР-частиц. Линии представляют теоретический спектр для гексагональной модификации гидроксиапатита. А) Дифрактограмма СаР-частиц, покрытых 5 кДа хитозаном; Б) Дифрактограмма СаР-частиц, покрытых 72 кДа гликоль-хитозаном. СаР-частицы получены по методике А (без охлаждения).

Покрытие хитозаном приводило к снижению кристалличности фосфата кальция по сравнению с непокрытыми СаР-частицами (п. 3.2.1), что хорошо коррелирует с литературными данными [178,180]. При этом, образец СаР-частиц, покрытый 5 кДа хитозаном содержал большее количество аморфной фазы по сравнению с покрытым гликоль-хитозаном, о чем свидетельствовали более высокая ширина линии пиков на дифрактограмме. Это, по-видимому, было связано с более кислой средой при покрытии 5 кДа хитозаном [82].

3.4.2. Морфология покрытых хитозанами СаР-частиц

Для более того, чтобы оценить, повлияло ли покрытие хитозаном на структуру и морфологию частиц, образцы СаР-частиц, покрытые 5 кДа хитозаном и гликоль-хитозаном, были исследованы методом растровой электронной микроскопии (РЭМ).

На снимках покрытых 5 кДа хитозаном СаР-частиц, полученных при охлаждении (методика Б), были видны частицы, средний диаметр которых составлял приблизительно 130 нм (Рис. 18), что вполне согласовывалось с данными, полученными методом ДСР (Табл. 19). После покрытия частицы сохранили округлую форму, которую мы наблюдали для непокрытых частиц (Рис. 12Б).

В случае СаР-частиц, полученных без охлаждения (методика А) и покрытых 5 кДа хитозаном (Рис. 19Б), видно, что частицы имели диаметр около 150 нм, что согласовывалось со значениями, полученными методом динамического светорассеяния (Табл. 19), и стержневую структуру, подобную непокрытым частицам, также полученным при охлаждении (Рис. 12А).

На изображении, полученном методом РЭМ для СаР-частиц, покрытых гликоль-хитозаном (Рис. 19В), видно, что частицы имели сферическую форму. Помимо отдельных частиц на снимке наблюдались также агрегаты размером до 1 мкм, которые, вероятнее всего, образовывались при высушивании образца частиц на подложке перед исследованием. Размер составляющих агломерат частиц составлял от 110 до 400 нм, что согласовывалось с данными, полученными методом динамического светорассеяния (Табл. 19).

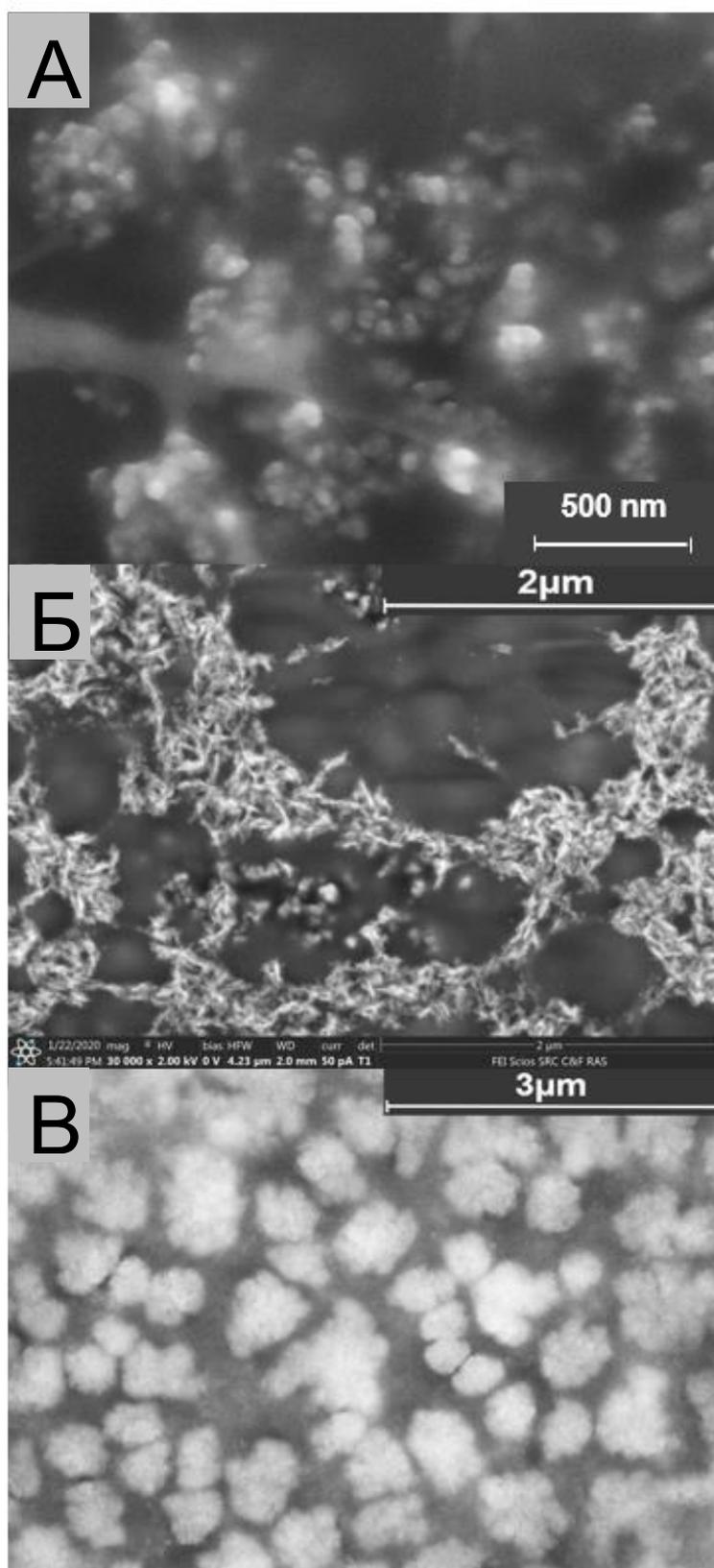


Рис. 18. Снимки СаР-частиц, полученные методом РЭМ: А) СаР-частицы, полученные по методике Б и покрытые 5 кДа хитозаном. СаР-частицы, полученные по методике А и Б) покрытые 5 кДа хитозаном и В) покрытые гликоль-хитозаном.

Следует отметить, что СаР-частицы, полученные по методике А (без охлаждения), имели стержневую структуру и использовались как для покрытия 5 кДа хитозаном, так и гликоль-хитозаном. Однако после покрытия гибридные частицы имели разную форму: покрытые 5 кДа хитозаном сохраняли «стержневую форму», а покрытые гликоль-хитозаном приобретали сферическую форму. Это можно объяснить, во-первых, различным рН при покрытии частиц (5,7 для 5 кДа, 6,8 для гликоль-хитозана), из-за чего могли произойти изменения в морфологии СаР-частиц; а во-вторых – различием молекулярных масс хитозанов: молекулярная масса гликоль-хитозана составляет около 72 кДа, что около 14 раз больше, чем молекулярная масса 5 кДа хитозана. Возможно, цепи гликоль-хитозана при покрытии частиц укладываются таким образом, что образуется околосферическая частица. При этом частицы, полученные по методике Б (с охлаждением) и покрытые 5 кДа хитозаном, также сохраняли исходную морфологию и представляли собой частицы округлой формы. Таким образом, покрытие 5 кДа хитозаном практически не влияло на форму частиц, тогда как покрытие гликоль-хитозаном приводило к образованию частиц округлой формы.

3.4.3. Эффективность покрытия СаР-частиц хитозанами

Эффективность покрытия СаР-частиц оценивали как долю хитозана, образующего покрытие частиц, к общему внесенному хитозану. Эффективность покрытия 5 кДа хитозаном составляла $13 \pm 2\%$, а гликоль-хитозаном $45 \pm 1\%$. В свою очередь 5 кДа содержание хитозана составляло 40 ± 2 мкг на 1 мг частицы, а гликоль-хитозана – 140 ± 5 мкг на 1 мг частиц.

В целом, эффективность покрытия частиц гликоль-хитозаном была выше, чем 5 кДа хитозаном. По-видимому, это связано с рН системы: хитозан – катионный полимер, поэтому его растворимость повышается с увеличением кислотности среды [10]. 5 кДа хитозан растворялся в средах со значениями рН не более 6,0, а гликоль хитозан был способен оставаться в растворе до достижения рН 7,5. При рН покрытия (5,7) 5 кДа хитозан уже обладал ограниченной растворимостью и частично выпадал в осадок, что обуславливало низкую эффективность покрытия СаР-частиц. При подборе условий покрытия 5 кДа хитозаном были произведены попытки уменьшить значение рН и концентрации хитозана, однако в первом случае происходило растворение СаР-частиц, а во-втором – было недостаточно хитозана для покрытия. В случае гликоль-хитозана, его способность растворяться в нейтральной среде обеспечивала более эффективное покрытие СаР-частиц.

Тем не менее, такая эффективность покрытия достаточна для применения гибридных частиц в качестве носителя лекарственных средств в офтальмологии, поскольку хитозана оказалось достаточно для того, чтобы частицы обладали положительным поверхностным зарядом (Табл. 20).

3.4.4. Изучение взаимодействия СаР-частиц и 5 кДа хитозана методом ИК-спектроскопии

Методом ИК-Фурье-спектроскопии производили оценку взаимодействия неорганического коа СаР-частиц, полученных при охлаждении по методике Б, и 5 кДа хитозана при покрытии.

Основной аналитически значимый диапазон в СаР-частицах – диапазон поглощения валентных колебаний PO_2^- -группы ($1220\text{--}1260\text{ см}^{-1}$) [242]. На взаимодействие СаР-частиц с хитозановой «оболочкой» четко указывало резкое снижение интенсивности в области $1260\text{--}1220\text{ см}^{-1}$ после покрытия частиц хитозаном (Рис. 19). По-видимому, основной участок взаимодействия СаР-частиц с катионными группами хитозана – фосфатная группа. Покрытие СаР-частиц 5 кДа хитозаном также приводило к снижению интенсивности в области $1600\text{--}1500\text{ см}^{-1}$ и смещению диапазона $1620\text{--}1700\text{ см}^{-1}$ в низкочастотную область за счет взаимодействия частиц с хитозаном. В то же время интенсивность пика поглощения, наблюдаемого для СаР-частиц при 950 см^{-1} (соответствует колебаниям связей C–N в хитозане [243]), увеличивалась в результате покрытия хитозаном. Таким образом, было доказано, что хитозан входит в состав гибридных частиц наряду с фосфатом кальция.

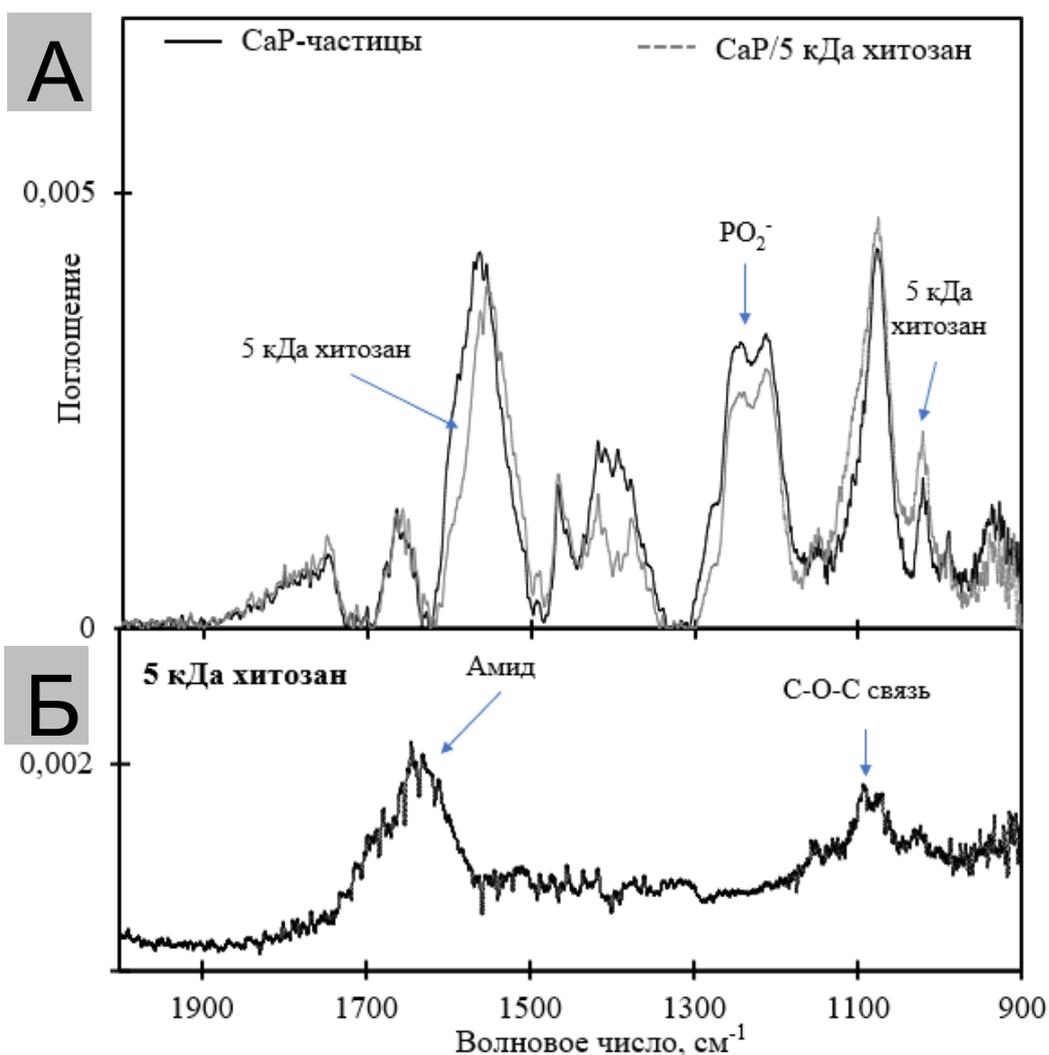


Рис. 20. Спектры, полученные методом ИК-Фурье спектроскопии, А) СаР-частицы (синий), гибридные частицы (оранжевый); Б) 5 кДа хитозан.

3.4.5. Стабильность СаР-частиц при хранении

Одним из важных параметров для использования носителей в медицине является их стабильность при хранении. Мы проводили изучение стабильности СаР-частиц, как непокрытых, так и покрытых хитозаном, в суспензии, при их концентрировании и разбавлении, при добавлении в систему 0,15М хлорида натрия при хранении при 4°C, а также при лиофильном высушивании с последующим ресуспендированием.

При хранении суспензии частиц (концентрация частиц составляла 1 мг/мл) сразу после синтеза при +4°C оказалось, что гидродинамический диаметр непокрытых частиц сохранялся неизменным, тогда как значение ζ -потенциала снижалось по модулю с -27 мВ до -18 мВ уже за 2 недели (Табл. 20, столбец 36 ± 2 См, Рис. 20А). Затем после 1 месяца хранения происходило увеличение гидродинамического диаметра до 450 нм. По-видимому,

происходило разрушение поверхностного слоя CaP-частиц, возможно, диссоциация стабилизирующих цитрат-анионов, из-за этого по модулю уменьшался ζ -потенциал, что приводило к агрегации частиц. Спустя 4 месяца хранения система теряла стабильность, и происходило выпадение осадка.

CaP-частицы, покрытые хитозаном, показали большую стабильность при хранении в суспензии по сравнению с непокрытыми: за 1 месяц наблюдалось небольшое падение ζ -потенциала при практически неизменном размере, за 4 месяца гидродинамический диаметр частиц увеличивался примерно в 2,5 раза, а ζ -потенциал падал в 3 раза, однако не наблюдалось выпадения осадка (Табл. 20, столбец 36 ± 2 См, Рис. 20 Б, В). Следует отметить, что и у покрытых хитозаном частиц, и у непокрытых по модулю при хранении ζ -потенциал стремился к нейтральному.

В лекарственные средства в форме растворов часто добавляют 0,15М NaCl для обеспечения ионной силы раствора, соответствующей ионной силе в физиологических жидкостях. Поэтому исследовали стабильность характеристик CaP-частиц, непокрытых и покрытых хитозанами, при хранении в присутствии 0,15М хлорида натрия (Табл. 20, столбец 225 ± 5 См). В целом, в присутствии физиологической концентрации соли CaP-частицы показали меньшую стабильность, чем в ее отсутствие: падение ζ -потенциала по модулю и увеличение размера происходило быстрее. Гидродинамический диаметр непокрытых частиц увеличился вдвое за 1 неделю хранения в 0,15М хлорида натрия, в то время как изменение характеристик частиц при хранении без соли началось спустя месяц.

Известно, что при введении электролита в суспензию частиц может происходить потеря устойчивости системы. Это явление называется концентрационной коагуляцией [244]. Потеря устойчивости вызывается сжатием диффузной части двойного электрического слоя (ДЭС) при неизменном потенциале поверхности. Сжатие ДЭС приводит к перемещению ионов из диффузионного слоя в адсорбционный, снижению ζ -потенциала и агрегации частиц. Следует отметить, что покрытие частиц хитозаном приводило к их стабилизации даже в условиях хранения в присутствии 0,15М хлорида натрия: по крайней мере в течение месяца характеристики частиц оставались практически неизменными.

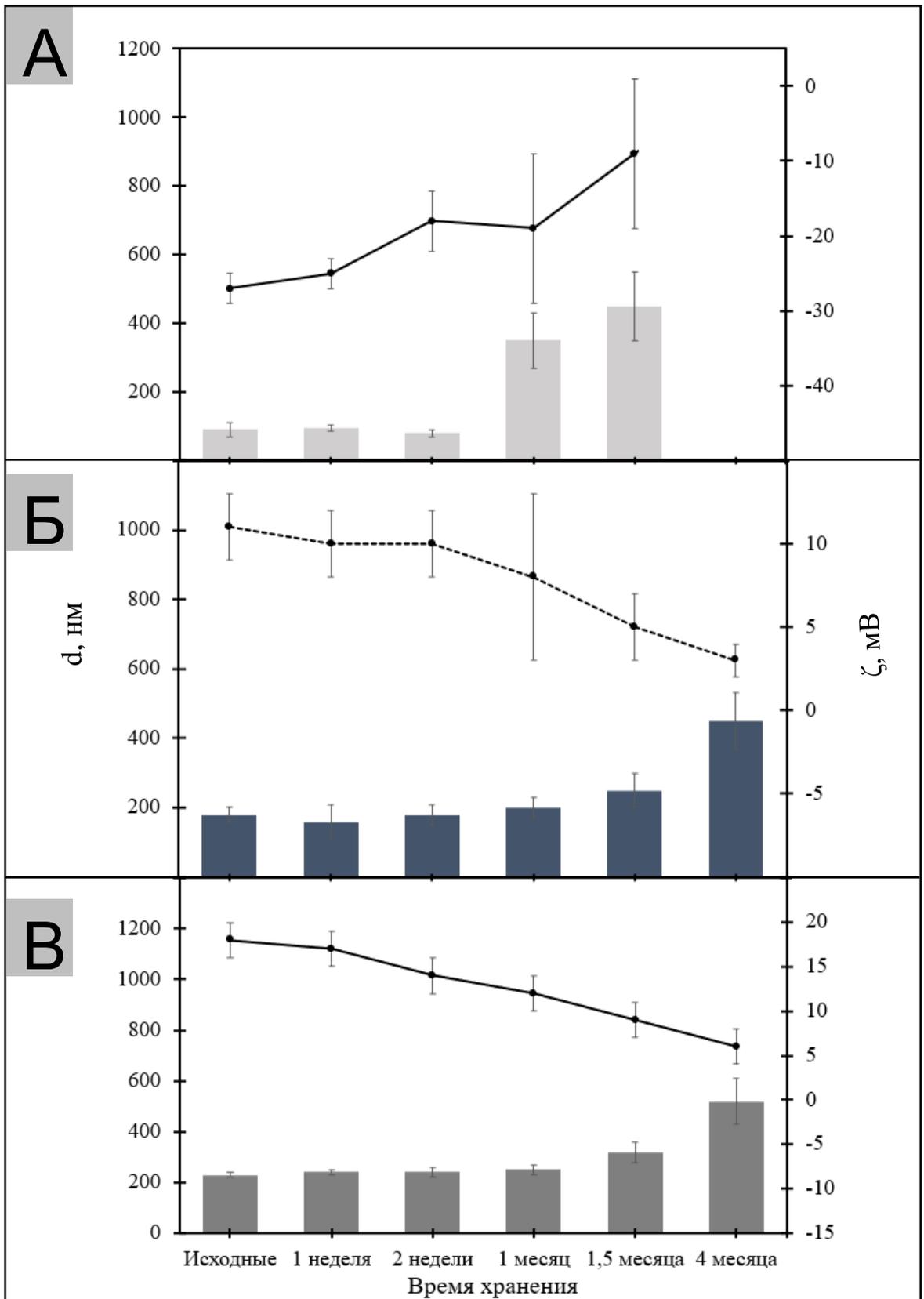


Рис. 20. Характеристики СаР-частиц при хранении в суспензии при 4°C: А) непокрытые частицы, Б) покрытые 5 кДа хитозаном, В) покрытые гликоль-хитозаном. Столбиками приведены данные по гидродинамическому диаметру, линией – по ζ-потенциалу

Табл. 20. Характеристики непокрытых и покрытых CaP-частиц с концентрацией 1 мг/мл при хранении в растворе при +4°C после синтеза, а также в присутствии 0,15M NaCl.

Проводимость		36±2 См (без NaCl)			225±5 См (0,15 M NaCl)		
Время хранения	Характеристики	CaP	CaP/5 кДа хитозан	CaP/гликоль-хитозан	CaP	CaP/5 кДа хитозан	CaP/гликоль-хитозан
исходные	d, нм	90±20	180±20	230±10	90±20	180±20	230±10
	ζ, мВ	-27±2	+11±2	+18±2	-27±2	+11±2	+18±2
	PDI	0,27	0,23	0,13	0,27	0,23	0,13
1 неделя	d, нм	95±10	160±50	240±10	200±50	200±50	230±10
	ζ, мВ	-25±2	+10±2	+17±2	-20±10	+9±2	+16±2
	PDI	0,15	0,22	0,17	0,6	0,47	0,17
2 недели	d, нм	80±10	180±30	240±20	280±50; 1000±200	250±50	220±10
	ζ, мВ	-18±4	+10±2	+14±2	-5±4	+9±3	+15±2
	PDI	0,29	0,3	0,17	0,6	0,38	0,28
1 месяц	d, нм	350±80	200±30	250±20	1000±300	240±20	230±10
	ζ, мВ	-19±10	+8±5	+12±2	0	+7±3	+12±2
	PDI	0,35	0,35	0,36	0,38	0,39	0,28
1,5 месяца	d, нм	450±100	250±50	320±40	осадок	450±20	600±50
	ζ, мВ	-9±10	+5±2	+9±2		+3±3	+5±2
	PDI	0,18	0,41	0,7		0,664	0,322
4 месяца	d, нм	осадок	450±80	520±90	осадок	610±50	780±75
	ζ, мВ		+3±1	+6±2		+5±3	+8±2
	PDI		0,41	0,7		0,37	0,41

При синтезе и покрытии СаР-частиц концентрация частиц в суспензии примерно составляла 1 мг/мл. Для изучения влияния концентрации частиц на их стабильность мы концентрировали и разбавляли водой исходную суспензию в 2 и в 5 раз (Табл. 21). Для непокрытых частиц наблюдали наибольшую стабильность характеристик при концентрациях 0,5 и 2 мг/мл, то есть, когда исходная суспензия была сконцентрирована и разбавлена в 2 раза. Однако при разбавлении системы в 5 раз происходило увеличение в размере более чем в 15 раз за 1 месяц. При разбавлении может наблюдаться десорбция потенциалопределяющего иона с поверхности дисперсной фазы, что может приводить к падению поверхностного потенциала и соответственно ζ -потенциала. Концентрирование коллоидной системы обуславливает прямо противоположное действие [244]. Это и наблюдается при хранении непокрытых СаР-частиц.

Для частиц, покрытых 5 кДа хитозаном, сохранялась тенденция более высокой стабильности при хранении в концентрации, близкой к исходной после синтеза (0,5 и 2 мг/мл). Однако в целом характеристики покрытых хитозаном СаР-частиц вне зависимости от концентрации изменялись значительно слабее, чем для непокрытых частиц. Для покрытых гликоль-хитозаном СаР-частиц практически не наблюдалось влияния величины концентрации на их характеристики (Табл. 21).

Табл. 21. Характеристики непокрытых и покрытых СаР-частиц при хранении в растворе при +4°С после синтеза при различных концентрациях.

Время хранения	Характеристики	СаР				СаР/5 кДа хитозан				СаР/гликоль-хитозан			
		0,2	0,5	2	5	0,2	0,5	2	5	0,2	0,5	2	5
исходные	Концентрация, мг/мл	0,2	0,5	2	5	0,2	0,5	2	5	0,2	0,5	2	5
	d, нм	90±10	90±10	90±10	90±10	230±20	230±20	230±20	230±20	260±25	260±25	260±25	260±25
	ζ, мВ	-25±3	-25±3	-25±3	-25±3	+12±2	+12±2	+12±2	+12±2	+16±2	+16±2	+16±2	+16±2
1 неделя	PDI	0,19	0,19	0,19	0,19	0,23	0,23	0,23	0,23	0,2	0,2	0,2	0,2
	d, нм	190±10	100±10	85±15	100±25	200±20	250±15	215±30	320±15	220±15	260±30	280±20	260±20
	ζ, мВ	-24±1	-21±3	-25±2	-24±4	+7±2	+12±2	+12±1	+13±2	+15±3	+15±1	+13±2	+10±2
2 недели	PDI	0,2	0,15	0,4	0,36	0,25	0,2	0,3	0,12	0,26	0,13	0,22	0,18
	d, нм	600±80	90±15	250±40	100±15	280±15	310±20	240±30	320±20	280±40	250±30	280±10	240±10
	ζ, мВ	-18±1	-25±2	-22±3	-24±2	+6±1	+12±2	+7±2	+5±1	+13±2	+13±3	+12±3	+11±2
3 недели	PDI	0,36	0,18	0,31	0,33	0,36	0,34	0,21	0,23	0,19	0,27	0,24	0,19
	d, нм	1000±220	280±20	240±45	300±30	450±50	290±40	340±35	500±90	340±40	290±20	260±35	260±15
	ζ, мВ	-16±4	-18±3	-20±2	-20±3	+5±2	+9±1	+5±3	+5±1	+9±3	+12±2	+12±1	+11±3
1 месяц	PDI	0,6	0,27	0,13	0,4	0,6	0,33	0,18	0,4	0,17	0,13	0,23	0,21
	d, нм	1500±350	350±25	300±20	480±55	500±50	280±15	340±25	520±60	350±30	280±30	300±45	280±25
	ζ, мВ	-12±4	-15±1	-18±3	-19±2	+4±2	+8±3	+6±2	+4±1	+9±4	+8±3	+7±3	+11±2
1 месяц	PDI	0,7	0,45	0,44	0,66	0,62	0,38	0,23	0,48	0,15	0,17	0,1	0,22

Непокрытые и покрытые хитозаном частицы также подвергали лиофилизации после диализа против деионизованной воды для удаления избыточных ионов. Лиофилизация и последующее ресуспендирование слабо повлияло на характеристики частиц (Табл. 22).

Табл. 22. Характеристики CaP-частиц после лиофилизации и последующего ресуспендирования

Характеристики	Частицы	исходные частицы		Лиофилизация	
		d, нм	ζ, мВ	d, нм	ζ, мВ
CaP		80±20	-25±2	90±30	-26±1
CaP/ 5 кДа хитозан		160±10	+12±1	190±40	+2±1
CaP/ гликоль-хитозан		260±15	+20±3	280±35	+13±3

Таким образом, при изучении стабильности при хранении CaP- и гибридных частиц в различных условиях, последние показали гораздо большую стабильность по сравнению с непокрытыми частицами.

В результате мы получили образцы гибридных частиц, состоящих из неорганического ядра фосфата кальция и хитозанового покрытия, которые по размеру и заряду представляются перспективными для применения в качестве носителя лекарственных средств в офтальмологии. Можно было полагать, что положительный заряд поверхности этих частиц способен обеспечить их высокое сродство к роговице, а благодаря размеру менее 500 нм они могут быть способными проникнуть во внутренние области глаза.

3.5. Включение препаратов в CaP-частицы, покрытые хитозанами

Лекарственные средства в офтальмологии чаще всего применяются в форме растворов. В связи с барьерным действием роговицы и смывом слезной жидкостью представляется перспективным усилить и пролонгировать действие препаратов путем их включения в частицы различной природы.

В качестве первого соединения для инкапсулирования в частицы мы выбрали широко применяемый в терапии гипертонии и сердечно-сосудистых заболеваний лекарственный препарат – низкомолекулярный ингибитор АПФ эналаприлат (Рис. 21). Ингибиторы АПФ способны снижать ВГД [29,120] и оказывать терапевтическое действие при таких заболеваниях, как увеит [195], ожог роговицы [24,196], глаукома [29], также имеют противовоспалительное и антиишемическое действие [24,25,199]. Эналаприлат

обладает высоким индексом липофильности [207], что позволяет ему эффективно проникать в ткани и связываться с мишенью – АПФ. При сравнительном исследовании действия различных ингибиторов АПФ (каптоприла, лизиноприла, эналаприлата) на ВГД у кроликов было показано, что наиболее сильное и продолжительное снижение ВГД наблюдалось при использовании эналаприлата [120].

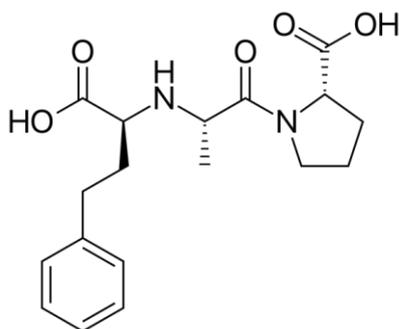


Рис. 21. Структура эналаприлата (ММ=348 Да)

Вторым соединением для включения в частицы была выбрана супероксиддисмутаза 1 (СОД1) человека. Ее молярная масса составляет 32,5 кДа, изоэлектрическая точка – 4,5; а удельная активность использованного препарата – 94 кU/мг. Этот фермент, катализируя реакцию дисмутации супероксид-аниона, защищает клетки от окислительного стресса, который является спутником множества различных глазных заболеваний таких, как увеит, глаукома, возрастная макулодистрофия и диабетическая ретинопатия, болезнь сухого глаза и др [16]. Препараты, содержащие СОД, способствуют нормализации внутриглазного давления, увеличению оттока водянистой влаги, улучшению остроты зрения при первичной открытоугольной глаукоме, а также обладают нейропротекторным действием [217].

Таким образом, оба выбранные для включения в носители соединения являются перспективными лекарственными средствами для применения в офтальмологии. Можно также было полагать, что совместное применение СОД1 и ингибитора АПФ, снижающих ВГД и обладающих противовоспалительным действием, позволит сделать более эффективной терапию таких заболеваний, как глаукома, увеит, диабетическая ретинопатия и др.

3.5.1. CaP-частицы с включенным эналаприлатом

3.5.1.1. Включение эналаприлата в CaP- и гибридные частицы

В настоящей работе для включения эналаприлата в CaP-частицы мы использовали две методики: включение препарата на стадии синтеза частиц (соосаждение) и сорбция препарата на готовых непокрытых и покрытых хитозаном частицах

А) Метод соосаждения

Эналаприлат включали на стадии получения CaP-частиц, получаемых по методике А: рН гидрофосфата калия 8,8; концентрация цитрата натрия 15,6 мМ, обработка ультразвуком без охлаждения при мощности 200 Вт.

Изучение зависимости характеристик CaP-частиц от концентрации эналаприлата при соосаждении показало, что при низких концентрациях около мкМ эналаприлат практически не встраивался в CaP-частицы (Табл. 23). При увеличении концентрации эналаприлата происходило последовательное увеличение процента включения. При этом гидродинамический диаметр CaP-частиц оставался практически постоянным, а ζ -потенциал понижался (Табл. 24). При значительном увеличении концентрации эналаприлата в системе до $2 \cdot 10^{-2}$ мМ сразу же после синтеза выпадал белый объемный осадок. Ранее было показано, что при увеличении концентрации фосфат-иона для получения частиц не удавалось получить стабильную систему, и происходило выпадение осадка [55]. Поскольку эналаприлат является двухосновной кислотой, увеличение его начальной концентрации при синтезе, возможно, действовало аналогично увеличению концентрации фосфат-иона и приводило к дестабилизации суспензии.

Табл. 23. Параметры CaP-частиц в зависимости от концентрации эналаприлата при соосаждении.

С(эналаприлата в суспензии), М	d, нм	PDI	ζ , мВ	Включение препарата, %
$8,6 \cdot 10^{-6}$	85±20	0,16	-25±2	0%
$6,0 \cdot 10^{-5}$	100±10	0,18	-28±2	19±3%
$3,0 \cdot 10^{-4}$	85±10	0,2	-26±5	27±4%
$1,2 \cdot 10^{-3}$	95±5	0,2	-30±1	34±7%
$3,6 \cdot 10^{-3}$	100±20	0,2	-31±3	40±10%
$9,2 \cdot 10^{-3}$	140±15	0,25	-34±2	77±9%
$2,0 \cdot 10^{-2}$	-	-	-	-

Концентрация эналаприлата в дальнейших экспериментах *in vitro* и *in vivo* составила 2,2 мМ или 0,78 мг/мл. Включение низкомолекулярного отрицательно заряженного эналаприлата в непокрытые СаР-частицы практически не изменяло размер частиц, но несколько понижало их ζ-потенциал по сравнению с пустыми с -25 мВ до -31 мВ (Табл. 24).

Включение эналаприлата в СаР-частицы, покрытые хитозаном, привело к увеличению размера, а также к некоторому снижению заряда относительно пустых покрытых частиц с +12 мВ до +7 мВ в случае низкомолекулярного хитозана и с +20 до +16 мВ в случае гликоль-хитозана (Табл. 24). Однако частицы оставались положительно заряженными, что требуется для адгезии частиц к роговице. С помощью покрытия хитозаном СаР-частиц удалось повысить процент включения эналаприлата. Процент включения препарата в частицы, покрытые 5 кДа хитозаном, был равен 66±5%, а в покрытые гликоль-хитозаном – 72±8%. Карбоксильные группы эналаприлата способны связываться с положительно заряженными аминогруппами хитозана, что, по-видимому, способствовало увеличению эффективности включения.

Табл. 24. Характеристики СаР-частиц пустых и с включенным эналаприлатом, полученных методом соосаждения при использовании терапевтической концентрации препарата в суспензии 2,2 мМ).

Частицы	d, нм	PDI	ζ, мВ	Включение препарата, %	Содержание препарата, мкг/мг
СаР	80±20	0,19	-25±1	-	
СаР/5 кДа хитозан	160±25	0,21	+12±2	-	
СаР/Гликоль-хитозан	240±20	0,25	+20±3	-	
СаР/Эналаприлат	110±20	0,2	-31±3	40±10	240±25
СаР/Эналаприлат/ 5 кДа хитозан	180±30	0,25	+7±3	66±5	340±20
СаР/Эналаприлат/ Гликоль-хитозан	260±30	0,27	+16±3	72±8	360±30

Полученные данные мы сравнили с ранее опубликованными данными по эффективности включения в СаР-частицы β -блокатора тимолола и ингибитора АПФ лизиноприла [8,53,54]. При использовании в качестве покрытия целлобиозы [8,53] эффективность включения лизиноприла была значительно ниже (37%), чем при использовании хитозана (75%) [54]. При этом эффективность включения тимолола в СаР-частицы, покрытые как целлобиозой (17%), так и хитозаном (10%), была невысока, хотя и в частицы, покрытые целлобиозой встраивалось больше препарата. По-видимому, это связано с тем, что тимолол представляет собой электронейтральную молекулу и не координирует ни с СаР-частицами, ни с покрывающим агентом.

Б) Метод сорбции

Для изучения зависимости включения эналаприлата в СаР-частицы, непокрытые и покрытые хитозаном двух видов, от вносимой концентрации препарата, образец СаР-частиц концентрировали в два раза, разбавляли раствором эналаприлата с необходимой концентрацией и оставляли на сутки при перемешивании для достижения равновесия между препаратом, сорбированным на частицах и в растворе.

Данные по сорбции представлены на рис. 22. 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 [245]. Изотермы типов II–IV обычно характерны для полимолекулярной адсорбции. Изотермам II и IV типа характерна высокая энергия взаимодействия адсорбируемого вещества и носителя, а изотермам III и V типа – более сильное взаимодействие между молекулами адсорбата. Для изотерм II и III типа адсорбция бесконечна при приближении к насыщению, в то время как для изотерм IV и V типа конечна. По-видимому, сорбция дикислоты эналаприлата на СаР-частицах с отрицательным ζ -потенциалом была несколько затруднена, тогда как в покрытых хитозаном частицах существовало электростатическое притяжение между отрицательно заряженными карбоксильными группами эналаприлата и хитозановым покрытием. Поэтому при одинаковых начальных концентрациях эналаприлат эффективнее сорбировался на покрытых хитозаном частицах. Помимо этого, вследствие более высокого ζ -потенциала покрытых гликоль-хитозаном частиц, изотерма сорбции относится к типу II – то есть к бесконечной сорбции, ограниченной только растворимостью эналаприлата в воде. С другой стороны, возможно, что для частиц, покрытых обоими видами хитозана, тип изотермы сорбции одинаков. Однако насыщение для покрытых гликоль-хитозаном частиц

могло находиться в области, которая находится за пределами растворимости эналаприлата, таким образом, его достижение невозможно.

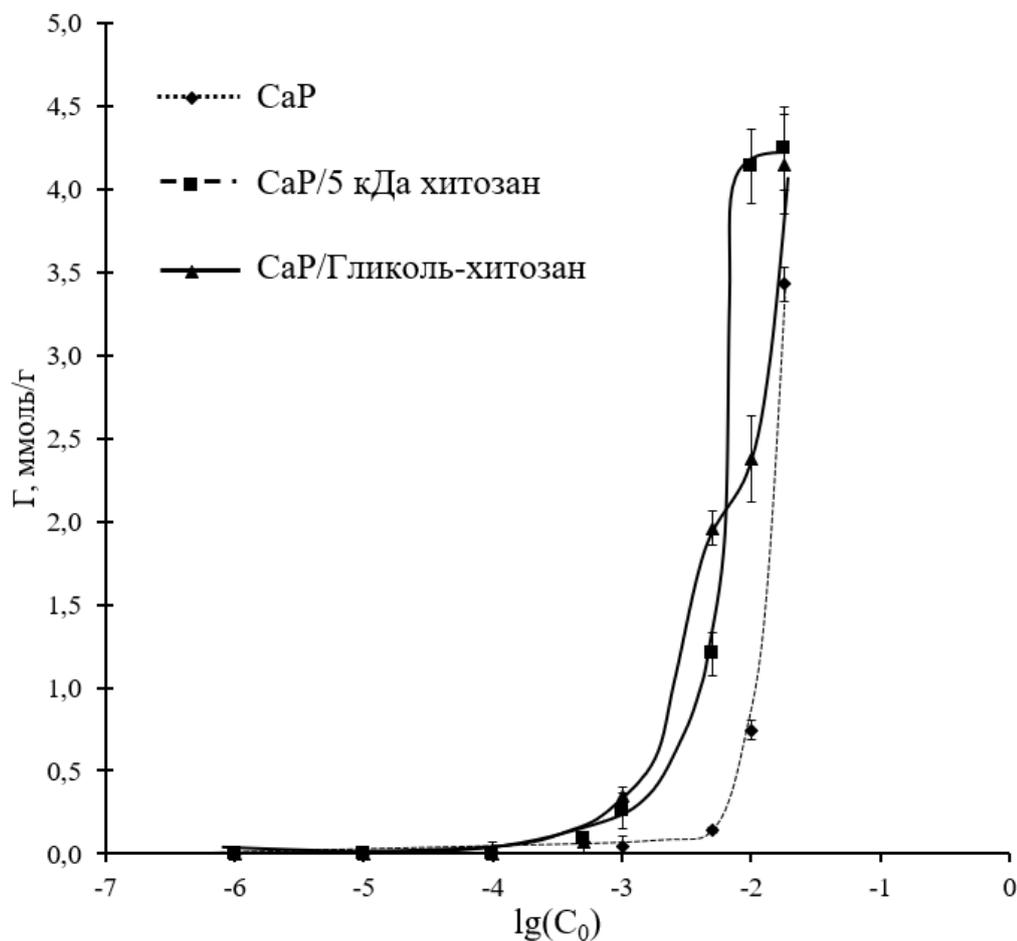


Рис. 22. Изотерма сорбции эналаприлата на непокрытых и покрытых хитозаном СаР частицах. Г – количество вещество сорбированного эналаприлата на 1 г частиц.

В) Сравнение соосаждения и сорбции

При использовании метода соосаждения для включения эналаприлата в СаР-частицы эффективность включения препарата была значительно выше, чем при использовании метода сорбции (Табл. 25): эффективность сорбции эналаприлата на непокрытых частицах составляла только $19 \pm 4\%$, при этом соосаждение позволило повысить процент включения в два раза до $40 \pm 10\%$. По-видимому, наличие двух карбоксильных групп в составе эналаприлата затрудняло сорбцию препарата на СаР-частицах за счет электростатического отталкивания эналаприлата и самих СаР-частиц, тогда как при соосаждении карбоксильные группы эналаприлата обеспечивали координацию эналаприлата с ионами кальция и включение его в состав СаР-частиц. В случае включения эналаприлата в СаР-частицы, покрытые 5 кДа хитозаном, процент включения составлял $37 \pm 7\%$ для метода сорбции, а для метода соосаждения - $66 \pm 5\%$. Как

видно, процент включения для метода соосаждения больше процента включения для метода сорбции в 1,8 раза. Величины процента включения при использовании обоих методов для инкапсуляции эналаприлата в CaP-частицы, покрытые гликоль-хитозаном, были соизмеримы ($63\pm 4\%$ для сорбции, $72\pm 8\%$ для соосаждения). По-видимому, это связано с довольно высокой величиной заряда покрытых гликоль-хитозаном CaP-частиц ($+20$ мВ), что позволяло отрицательно заряженному эналаприлату эффективно взаимодействовать с частицами, обеспечивая высокую загрузку препарата. В отличие от частиц, покрытых гликоль-хитозаном, которые обладали зарядом $+20$ мВ, частицы, покрытые 5 кДа хитозаном, обладали $+12$ мВ, таким образом, эналаприлат хуже сорбировался на них. При этом, как при использовании сорбции, так и осаждения, процент включения эналаприлата в покрытые хитозаном частицы был значительно выше, чем в непокрытые, что, возможно, было связано с взаимодействием карбоксильных групп эналаприлата с аминогруппами хитозана.

Таким образом, на основании сравнения данных по эффективности включения, нами был выбран метод соосаждения для включения эналаприлата как в непокрытые частицы, так и покрытые хитозаном.

Табл. 25 Эффективность включения в CaP-частицы эналаприлата (%) при концентрации в суспензии 2,2 мМ.

Частицы \ Метод	Сорбция	Соосаждение
CaP/Эналаприлат	19 ± 4	40 ± 10
CaP/Эналаприлат/5 кДа хитозан	37 ± 7	66 ± 5
CaP/Эналаприлат/Гликоль-хитозан	63 ± 4	72 ± 8

3.5.1.2. Изучение кинетики высвобождения эналаприлата

Кинетика высвобождения препарата из частиц является важной характеристикой для его применения *in vivo*, поскольку она может влиять на фармакокинетику, биодоступность, а также терапевтическую эффективность лекарственного препарата. Поскольку CaP-частицы предлагаются нами в качестве носителя лекарственных средств в офтальмологии, было необходимо изучить высвобождение в среде, моделирующей слезную жидкость. Она имеет pH 6,5-7,5 и содержит 0,15 М NaCl [35]. Поэтому кинетику высвобождения изучали путем инкубации суспензии частиц с физраствором при pH 7,5.

Препарат удерживался в непокрытых CaP-частицах не более 45 минут, при этом за 5 минут высвобождалось более 60% эналаприлата. После 45 минут инкубации с 0,15 М NaCl эналаприлат полностью высвобождался из непокрытых хитозаном частиц (Рис. 23). Быстрое высвобождение эналаприлата могло быть связано как с электростатическим отталкиванием, поскольку и препарат, и частицы заряжены отрицательно; так и с высокой пористостью частиц: молекулы эналаприлата значительно меньше размера пор (13 нм), поэтому могли свободно диффундировать в раствор вне частицы.

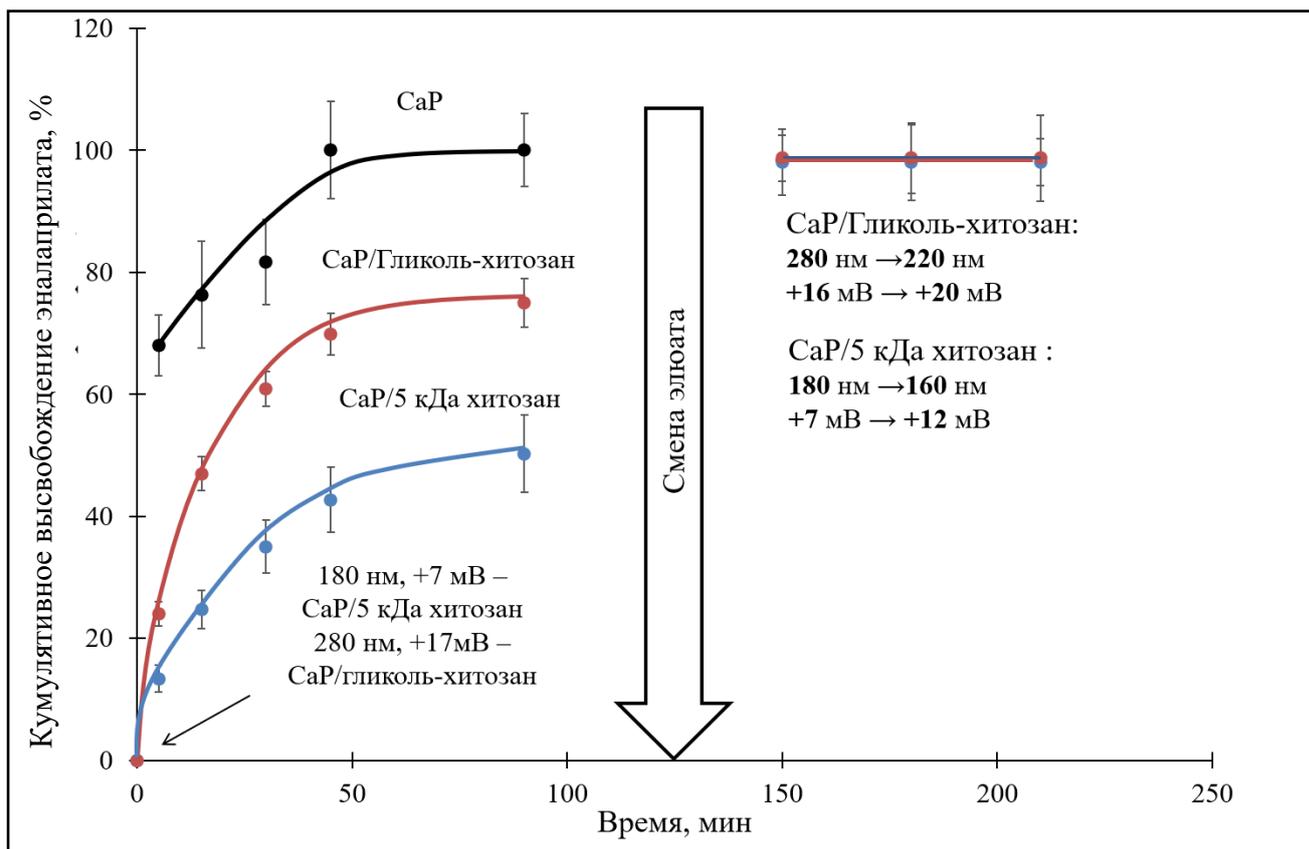


Рис. 23. Кинетика высвобождения эналаприлата из CaP-частиц до и после покрытия 5 кДа хитозаном и гликоль-хитозаном, при инкубации в физиологическом растворе.

Как видно из рис. 23 скорость высвобождения из частиц, покрытых хитозаном, была значительно меньше, чем из непокрытых частиц. По-видимому, это было связано с электростатическим взаимодействием препарата с положительно заряженными аминогруппами хитозана, из-за этого препарат значительно дольше удерживался в составе частиц. Однако в состоянии равновесия процент высвобождения эналаприлата из CaP-частиц, покрытых 5 кДа хитозаном, достигал 50%, в то время как для гликоль-хитозана эта величина составляла 80% (Рис. 23), то есть, скорость высвобождения препарата в случае гликоль-хитозана была выше, чем в случае 5 кДа хитозана. Более медленное

высвобождение эналаприлата из частиц, покрытых 5 кДа хитозаном, было связано, по-видимому, с размером хитозановых цепей: CaP-частицы имели пористое строение, и, вероятно, относительно небольшие молекулы 5 кДа хитозана более равномерно покрывали частицы, тем самым более эффективно удерживая препарат, в отличие от гликоль-хитозана с молекулярной массой 72 кДа.

Осаждённые после достижения равновесия с физраствором частицы инкубировали ещё раз с раствором 0,15 М NaCl, повторяя все те же действия, что и при первом промывании. При смене элюирующего раствора из CaP-частиц, покрытых как 5 кДа хитозаном, так и гликоль-хитозаном, высвобождался оставшийся эналаприлат, при этом размер частиц оставался практически неизменным, а ζ -потенциал возвращался к значению для пустых CaP-частиц, покрытых соответствующим видом хитозана.

Таким образом, изучение кинетики высвобождения эналаприлата из CaP-частиц показало, что препарат способен полностью десорбироваться из носителя. Высвобождение препарата из частиц является необходимым условием для применения частиц *in vivo*, так как эналаприлат должен достичь мишени в тканях глаза – АПФ. При этом, покрытие частиц хитозаном позволило увеличить время высвобождения, что может обеспечить пролонгированное действие препарата.

Модели кинетики высвобождения

Для изучения механизма высвобождения эналаприлата из наночастиц полученные данные были аппроксимированы с использованием различных математических моделей (Табл. 7) [231]. Модель первого порядка применима в тех случаях, когда скорость высвобождения препарата из носителя зависит от его концентрации. Уравнение Хигучи описывает высвобождение лекарственного вещества из нерастворимого матрикса и не распространяется на набухающую полимерную систему. Модель Хиксона-Кроуэлла описывает случаи, когда матрица подвергается биодеструкции, например, гидролитической или ферментативной. Полуэмпирическую экспоненциальную модель Корсмейера-Пеппаса также часто используют для описания высвобождения препарата из гидрофильной полимерной матрицы.

Уравнения первого порядка и Хигучи с меньшей точностью описывали процесс высвобождения эналаприлата из частиц, что, вероятно, связано с диффузией растворителя во внутреннюю область частиц, которую данные модели не учитывают. Модель Хиксона-Кроуэлла используется в предположении, что скорость высвобождения ограничена скоростью растворения частиц, а не диффузией препарата, что не наблюдалось в нашей

системе. Наиболее подходящая модель оценивалась с помощью коэффициента корреляции (Табл. 26).

Табл. 26. Аппроксимация данных с использованием различных математических моделей высвобождения включенного эналаприлата.

Модель	Корсмейер-Пеппас			Хигучи		Первый порядок		Хиксон-Кроуэлл	
	К	n	R ²	К	R ²	К	R ²	К	R ²
СаР/ Эналаприлат	0,58	0,10	0,99	$4,8 \cdot 10^{-2}$	0,86	$9,1 \cdot 10^{-3}$	0,96	$2,5 \cdot 10^{-3}$	0,95
СаР/5 кДа хитозан/ Эналаприлат	0,066	0,47	0,98	$5,2 \cdot 10^{-2}$	0,96	$1,3 \cdot 10^{-2}$	0,72	$2,4 \cdot 10^{-3}$	0,91
СаР/Гликоль- хитозан/ Эналаприлат	0,11	0,53	0,99	0,17	0,87	$1,1 \cdot 10^{-2}$	0,60	$1,7 \cdot 10^{-3}$	0,71

Как видно из данных, приведенных в табл. 26, наиболее подходящей моделью для описания высвобождения эналаприлата из всех образцов частиц являлась модель Корсмейера-Пеппаса. Эта модель указывает на диффузионно-контролируемое высвобождение препарата из разработанной системы, где «n» - показатель степени диффузионного высвобождения, который можно использовать для характеристики различных механизмов высвобождения [$n \leq 0,45$ фиковская диффузия, $0,45 < n < 1$ нефиковская диффузия]. Показатель «n» отражает вклад процессов диффузии и десорбции в кинетику высвобождения: то есть увеличение «n» указывает на возрастающую роль диффузии. Значение «n» для непокрытых СаР-частиц соответствует фиковской диффузии, а для СаР-частиц, покрытых 5 кДа хитозаном и гликоль-хитозаном 72 кДа – нефиковской диффузии.

3.5.1.3. Стабильность частиц с включенным эналаприлатом

Непокрытые CaP-частицы, содержащие эналаприлат, увеличивались в размере более чем в три раза за месяц. Возможно, агрегация частиц происходила из-за нивелирования заряда поверхности частиц вследствие разрушения поверхностного ионного слоя. Однако покрытые как 5 кДа хитозаном хитозаном, так и гликоль-хитозаном, частицы, содержащие эналаприлат, при хранении в растворе при +4°C показали неизменность размера по крайней мере в течение месяца (Табл. 27).

Табл. 27. Характеристики CaP-частиц, содержащих лекарственные препараты, при хранении при 4°C в суспензии после синтеза.

Время хранения	Характеристики	CaP/ эналаприлат	CaP/ эналаприлат/ 5 кДа хитозан	CaP/ эналаприлат/ Гликоль-хитозан
исходные	d, нм	100±15	190±20	280±20
	ζ, мВ	-31±3	+5±1	+17±2
	PDI	0,2	0,18	0,17
1 неделя	d, нм	180±20	190±15	320±20
	ζ, мВ	-15±2	+5±2	+16±1
	PDI	0,25	0,2	0,2
2 недели	d, нм	200±10	200±20	320±15
	ζ, мВ	-10±2	+4±1	+16±3
	PDI	0,28	0,22	0,23
3 недели	d, нм	250±45	210±30	330±30
	ζ, мВ	-9±3	+4±2	+14±2
	PDI	0,33	0,23	0,28
1 месяц	d, нм	350±70	220±30	350±30
	ζ, мВ	-8±1	+4±2	+14±1
	PDI	0,4	0,25	0,29

В целом, эналаприлат-содержащие частицы были менее стабильны по сравнению с частицами, не содержащими лекарственный препарат (Табл. 20, 27). В итоге, с помощью покрытия CaP-частиц хитозаном удалось добиться значительного повышения стабильности суспензии частиц с включенным эналаприлатом.

3.5.1.4. CaP-частицы, содержащие эналаприлат и покрытые хитозанами, в экспериментах *in vivo*

Эксперименты *in vivo* проводились в течение нескольких лет на различных партиях лабораторных животных. Этим мы объясняем различия, наблюдающиеся при исследованиях одинаковых образцов в экспериментах по снижению ВГД. При общей тенденции данные, полученные в разное время, не совсем совпадали, таким образом, их было некорректно сравнивать количественно. Однако во всех экспериментах присутствовал контроль – свободный препарат в растворе. Благодаря этому сравнение результатов экспериментов *in vivo* становилось более корректным. Отметим, что после получения частиц их не отделяли от препарата в растворе. Каждая серия экспериментов по удерживанию препаратов в слезной жидкости и снижению ВГД имела по крайней мере три повтора в каждый период времени.

А) Сравнение эффективности удерживания эналаприлата в слезной жидкости в составе частиц или в форме раствора

Закапывание любого фармацевтического продукта в глаз сопровождается его потерей вместе с естественным дренированием слезы, и только часть его может проникнуть через переднюю поверхность глаза и попасть во внутренние части глаза. Мы сравнили временные профили наличия эналаприлата в слезной жидкости после однократной инстилляцией свободного эналаприлата и эналаприлата в суспензии CaP-частиц, покрытых двумя видами хитозана. Относительное количество эналаприлата в слезной жидкости оценивали по его способности ингибировать контрольный АПФ, то есть чем больше была активность АПФ, тем меньше эналаприлата в среде.

Показано, что первичное удаление эналаприлата из слезной жидкости происходило очень быстро, поскольку ингибирование АПФ значительно снижалось. Объем слезы (около 7-8 мкл [38]) значительно меньше объема капли (50 мкл), поэтому избыток закапанного препарата сразу вытекал через слезно-носовой канал. Тем не менее, некоторое количество эналаприлата было обнаружено в слезной жидкости даже через 2 часа после закапывания эналаприлат-содержащих CaP-частиц, покрытых хитозаном, а свободный эналаприлат к этому времени полностью вымывался (Рис. 24). Остаточная концентрация эналаприлата в слезной жидкости через 2 часа после однократной инстилляцией составила около 20 нМ для частиц, покрытых хитозаном 5 кДа хитозаном и гликоль-хитозаном. Таким образом, включение эналаприлата в CaP-частицы, покрытые хитозаном, способствовало увеличению

времени его жизни в слезной жидкости, по-видимому, за счет удерживания гибридных частиц на поверхности роговицы.

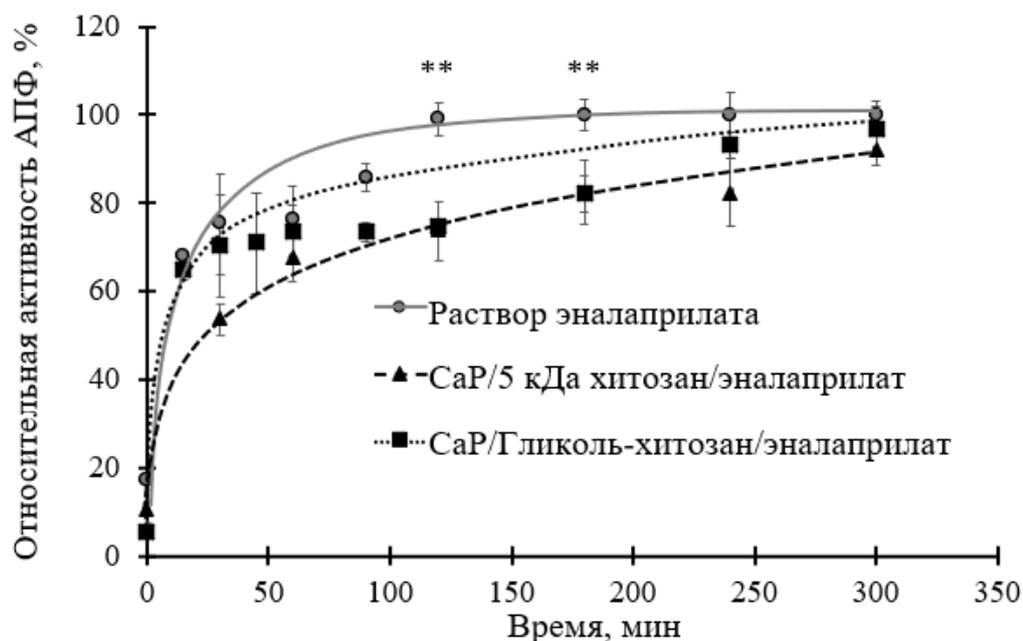


Рис. 24. Удерживание эналаприлата в слезной жидкости кроликов с течением времени после однократной местной инстилляцией препарата (каждая группа содержала 3 кролика – 6 глаз). На рисунке приведены усредненные данные из 3 экспериментов.

Б) Исследование влияния эналаприлата в составе частиц или в растворе на внутриглазное давление (ВГД)

Для экспериментов по снижению ВГД использовали эналаприлат-содержащие CaP-частицы, гибридные частицы в суспензии, полученной после покрытия частиц двумя видами хитозана, а также контрольный раствор с идентичной концентрацией 2,2 мМ эналаприлата в 12,5 мМ фосфатном буфере. Для каждого образца в эксперименте участвовало 12 кроликов (24 глаза). Значение ВГД для интактных кроликов измеряли после местного введения суспензии пустых CaP-частиц. Все растворы и суспензии для инстилляций имели значение pH 7,2-7,5.

На рис. 25 А,Б,В представлены данные по снижению ВГД при однократной инстилляцией кроликам суспензии непокрытых или покрытых хитозаном CaP-частиц с включенным эналаприлатом, а также эналаприлата в растворе. Через 1 час после инстилляцией не было статистического различия между препаратом в непокрытых CaP-частицах и в растворе, однако данные по падению ВГД были достоверны на 2, 3 и 6 часу после инстилляцией. Более того, препарат в составе CaP-частиц имел пролонгированное действие.

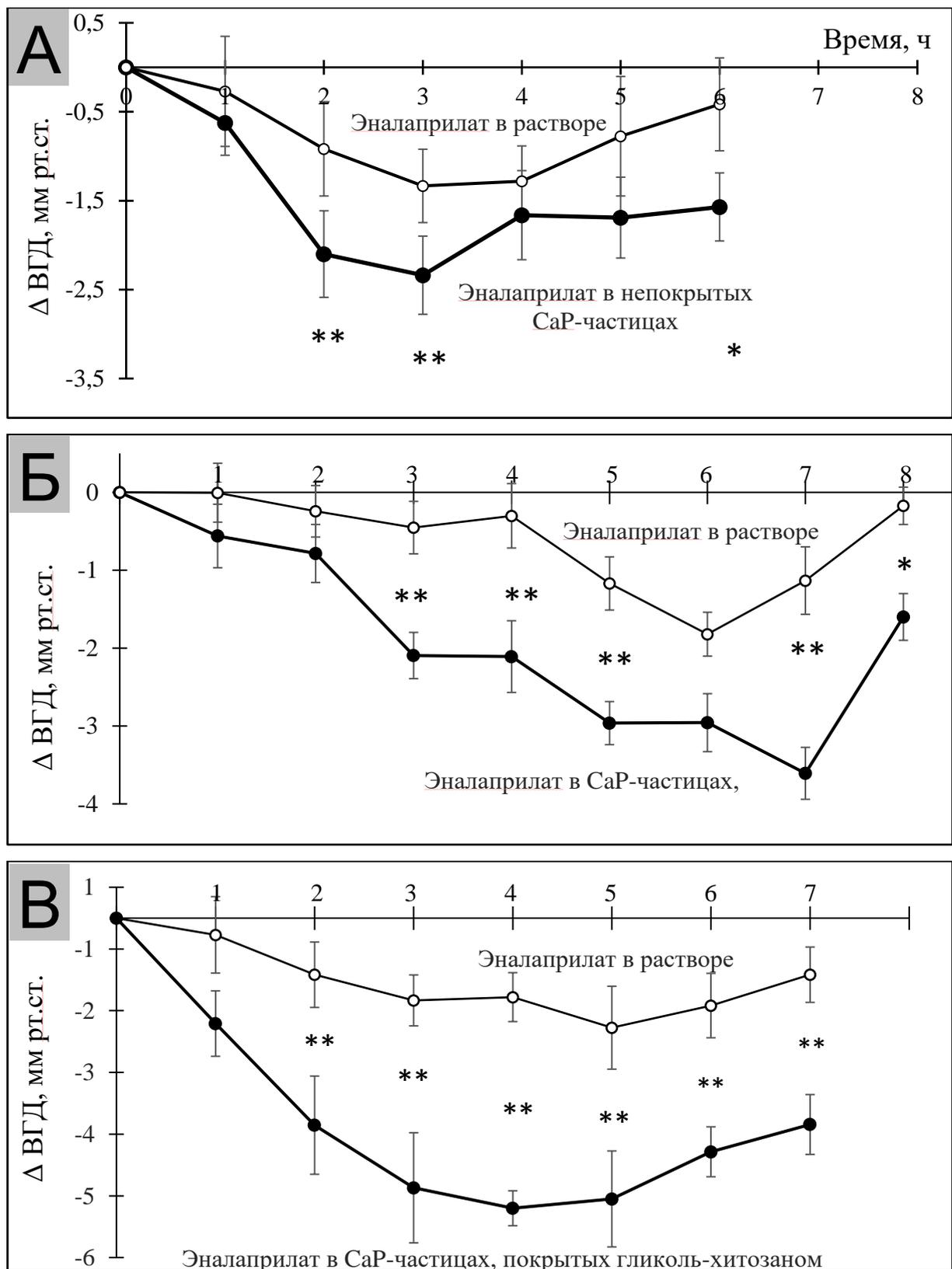


Рис. 25. Снижение ВГД у кроликов после однократной инстилляцией эналаприлата в растворе и в составе СаР-частиц А) непокрытых Б) покрытых 5 кДа хитозаном; В) покрытых гликоль-хитозаном. * – $U_{\text{эмп}} \leq U_{0,05}$, ** – $U_{\text{эмп}} \leq U_{0,01}$ (различия между значениями падения ВГД достоверны).

Введение эналаприлата в составе гибридных частиц (частиц, состоящих из неорганического кора фосфата кальция и хитозанового покрытия) приводило к более резкому и сильному падению ВГД по сравнению с водной формой препарата. По сравнению с эналаприлатом непокрытых частицах, в первые 2 часа падение ВГД происходило быстрее, чем для покрытых 5 кДа хитозаном, что, по-видимому, связано с более быстрым вымыванием препарата из непокрытых частиц (Рис. 23). Следует отметить существенно больший эффект на величину максимального падения ВГД в случае эналаприлата в составе частиц, покрытых гликоль-хитозаном (Рис. 25А, Б, В). Вероятно, это связано с тем, что покрытые гликоль-хитозаном частицы имеют более высокий ζ -потенциал (Табл. 24), и, следовательно, обладают большим сродством к отрицательно заряженным клеткам роговицы, чем непокрытые и покрытые 5 кДа хитозаном.

Важно, что если после закапывания водного раствора эналаприлата величина ВГД через 8 часов возвратилась к исходным значениям, то при закапывании препарата, включенного в частицы, статистически достоверное понижение ВГД наблюдалось даже спустя 8 часов после инстилляции препарата. Можно полагать, что благодаря мукоадгезивным свойствам хитозана, покрытые им частицы удерживались на муциновом слое роговицы, что, свою очередь, могло приводить к продолжительному проникновению препарата во внутренние области глаза и пролонгированию действия препарата [133].

Таким образом, мы показали, что применение эналаприлата в составе СаР-частиц приводило к более значительному и пролонгированному снижению ВГД при инстилляции в глаз по сравнению с препаратом в растворе. При этом эналаприлат в покрытых хитозаном СаР-частицах приводил к более значительному эффекту по снижению ВГД по сравнению с непокрытыми, что может быть связано со сродством гибридных частиц к роговице благодаря их положительному ζ -потенциалу.

В) Восстановление увеального кровотока при ишемии глаза

Основное питание тканей глаза обеспечивается сосудистой оболочкой или увеальным трактом [195]. Нарушение увеального кровотока приводит к ишемии глаза. Она характеризуется нарушением внутриглазного кровообращения в результате ограничения или прекращения притока артериальной крови в глаз при сохранении нормального оттока венозной крови. Как известно, ингибиторы АПФ могут восстанавливать локальный кровоток при местных инстилляциях при ишемии конъюнктивы при ожоге глаза [24]. В рамках данной работы мы впервые исследовали действие эналаприлата в составе СаР-

частиц, покрытых 5 кДа хитозаном, на эффективность восстановления увеального кровотока при индуцированной ишемии.

В связи с ограниченным числом животных, эксперименты проводили только для частиц, содержащих эналаприлат и покрытых 5 кДа хитозаном с использованием пяти кроликов. Для оценки интенсивности кровотока в глазу кроликов был применен метод офтальмоплетизмографии. С ее помощью проводилось измерение интенсивности кровенаполнения сосудов увеального тракта глаза. Методика основана на регистрации пульсовых колебаний объема глазного яблока в течение сердечного цикла, возникающих как следствие пульсации внутриглазных сосудов. Основной показатель, который характеризует кровоток в глазу, используемый в исследовании – это минутный объем кровотока, соответствующий суммарному объему крови, протекающей во время сердечного цикла через системы увеальных сосудов в течение 1 мин [232].

Показано, что при инстилляциях эналаприлата в составе СаР-частиц за 30 минут до индуцирования ишемии, затем – сразу после индуцирования, увеальный кровоток восстанавливался до первоначального значения через 150 минут после индуцирования ишемии, в то время как при использовании эналаприлата в форме раствора увеальный кровоток не восстанавливался до первоначального значения даже спустя 210 минут после индуцирования ишемии (Рис. 26). К сожалению, из-за недостаточного числа животных не удалось получить статистически достоверные данные по восстановлению кровотока.

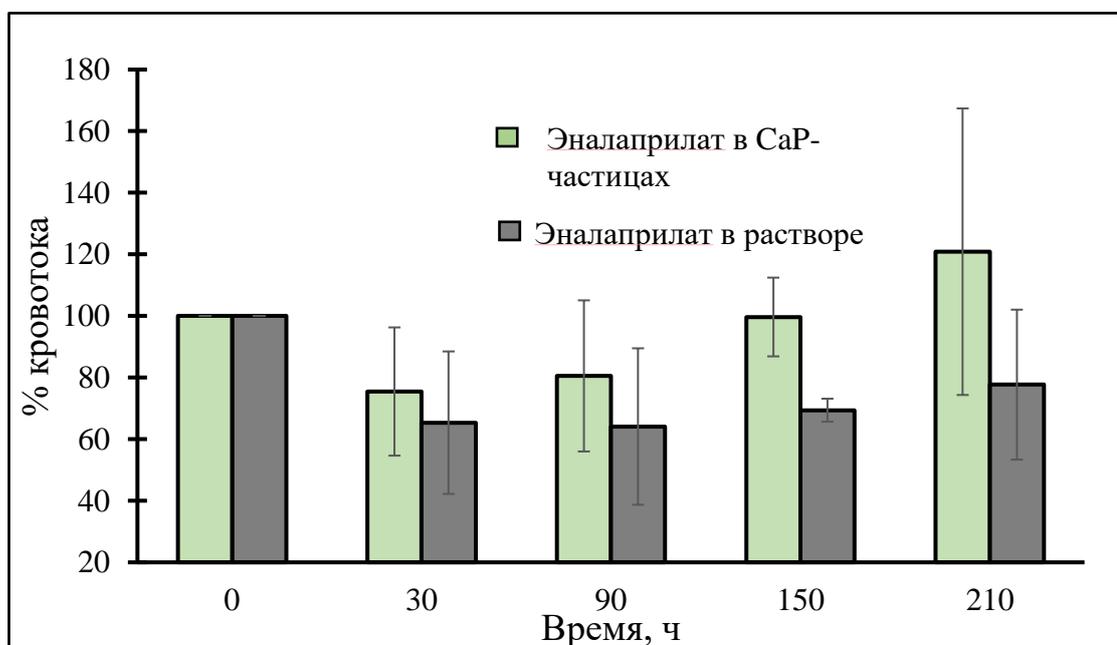


Рис. 26. Восстановление увеального кровотока при использовании эналаприлата в составе СаР-частиц и в форме раствора при индуцированной ишемии.

Таким образом, результаты, полученные в экспериментах *in vivo*, показали, что инкапсулирование эналаприлата в CaP-частицы и покрытие их хитозаном позволило увеличить гипотензивное действие препарата и привело к пролонгации действия по снижению ВГД. Также использование эналаприлата в составе частиц перспективно с точки зрения восстановления увеального кровотока при индуцированной ишемии.

3.5.2. CaP-частицы с включенной супероксиддисмутазой 1

3.5.2.1. Изучение стабильности СОД1

Супероксиддисмутаза 1 – фермент белковой природы. CaP-частицы с включенным эналаприлатом получали при обработке раствора ультразвуком, что приводило к повышению температуры системы до 60-70°C. Поскольку возможен разогрев системы при синтезе, было необходимо проверить стабильность фермента в предполагаемых условиях получения CaP-частиц.

СОД1 сохраняла активность после инкубации в течение часа при температурах 30, 40, 50 и 60°C. Однако при 70°C активность СОД1 значительно снижалась до 53%. Термостатирование СОД1 при 80°C вызвало уменьшение активности до 26% (Рис. 27).

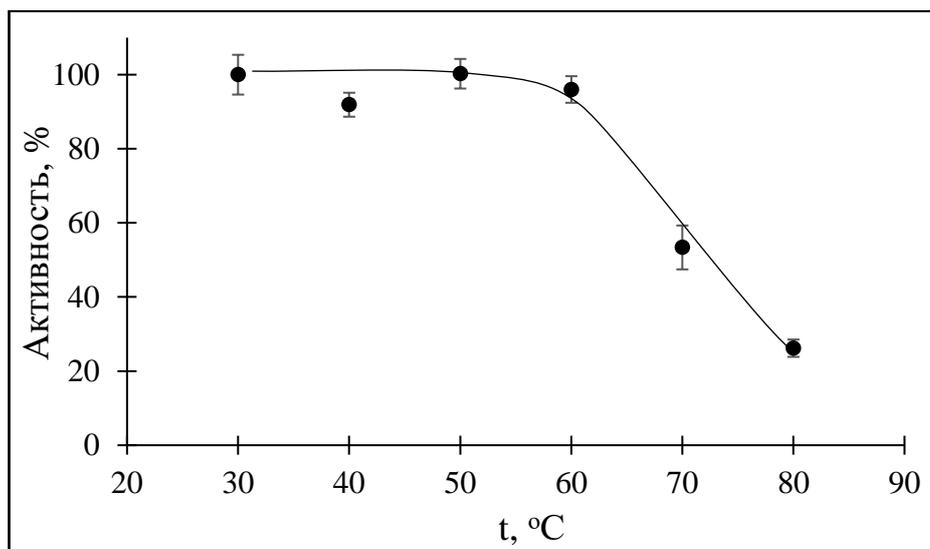


Рис. 27. Зависимость активности СОД1 от температуры инкубирования. Условия: термостатирование 1 час в буфере, содержащем 12,5 мМ гидрофосфата калия, 15,6 мМ цитрата натрия, 25 мМ NaCl, pH 7,0.

Таким образом, мы показали, что фермент термостабилен в интервале температур от 30°C до 60 °C, однако разогрев реакционной смеси во время синтеза частиц до 60-70°C мог привести к существенной потере активности. Но поскольку для получения частиц оптимальных размеров требуется обработка ультразвуком в течение всего 20 минут, было

произведено исследование кинетики инактивации СОД1 при 60°C и 70°C. При инкубации СОД1 при 60°C активность сохранялась даже спустя 30 минут. При 70°C активность фермента сохранялась в течение 20 минут термостатирования, а спустя 30 минут уменьшалась на 7%. Таким образом, получение СаР-частиц с включенной СОД1 можно осуществлять в тех же условиях, что и с включенным эналаприлатом, то есть при повышенной температуре. Эти данные показали потенциальную возможность получения СаР-частиц, содержащих СОД1, по методике А – без охлаждения (Табл. 14).

Также необходимо было изучить влияние непосредственно ультразвуковой обработки с постоянной мощностью 200 Вт на активность СОД1. Продемонстрировано, что обработка ультразвуком раствора СОД1 в течение 10 и 20 минут не приводила к существенной потере активности фермента.

Таким образом, мы убедились в том, что обработка реакционной смеси ультразвуком, а также повышение температуры реакционной смеси существенно не влияли на активность СОД1, что могло позволить использовать для включения СОД1 в частицы метод соосаждения без охлаждения.

3.5.2.2. Включение СОД1 в гибридные частицы

Для включения СОД1 в СаР-частицы был выбран метод соосаждения, поскольку эффективность включения эналаприлата при соосаждении была значительно выше, чем при сорбции (п. 3.5.1.2). Была произведена попытка включить СОД1 в тех же условиях, что и эналаприлат. Однако обработка реакционной смеси ультразвуком с мощностью 200 Вт привела к интенсивному образованию мелкодисперсной пены (Рис. 28), устойчивой в течение нескольких часов, чего не наблюдалось при обработки ультразвуком растворов СОД1.

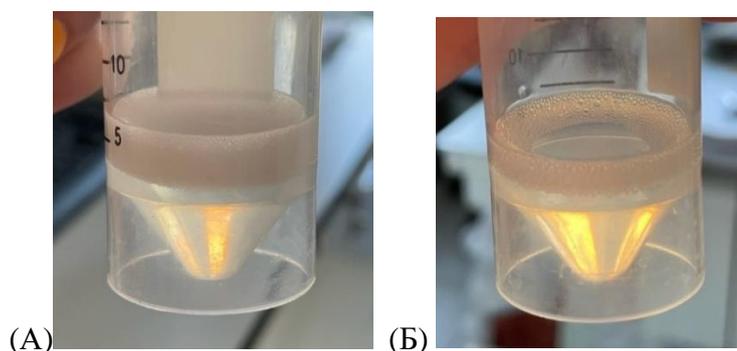


Рис. 28. Образование пены при включении СОД1 в СаР-частицы (а) мощность ультразвука 200 Вт и 160 Вт, (б) мощность ультразвука 120 Вт.

Этот факт предположительно связан с наличием твердых СаР-частиц в растворе, ведь пенообразование протекает интенсивнее на границе раздела фаз. Как известно, белки являются стабилизаторами пен [246], эту роль в нашем случае и сыграла СОД1, поскольку в отсутствие фермента образования пены не происходило. При этом активность СОД1, измеренная после оседания пены, сохранялась после пенообразования. Однако из-за того, что СОД1 адсорбировалась на пене, включить СОД1 в частицы не удалось (Табл.).

Помимо этого, образование пены оказывало влияние и на процесс формирования частиц. Полученные СаР-частицы имели меньший гидродинамический диаметр, чем синтезированные в аналогичных условиях без СОД1 (Табл. 28). Из литературы известно, что наличие поверхностно-активных веществ в системе при получении СаР-частиц может приводить к уменьшению размера [85].

Для предотвращения образования пены мощность ультразвука была снижена до 160 Вт, однако пена по-прежнему образовывалась в таком же объеме (Рис. 28А). При этом СОД1 все так же не включалась в частицы (Табл. 28). Дальнейшее снижение мощности до 120 Вт позволило немного понизить интенсивность образования пены (Рис. 28Б), процент включения СОД1 в СаР-частицы составил 5% (Табл. 28).

Табл. 28. Характеристики СаР-частиц в зависимости от мощности ультразвука в присутствии СОД1.

Мощность, Вт	d, нм	PDI	ζ, мВ	% включения СОД1
200	30 ± 10	0,56	-29 ± 4	Не включилась
160	70 ± 15	0,17	-27 ± 2	Не включилась
120	100± 20	0,14	-28 ± 5	Около 5%

Дальнейшее понижение мощности ультразвуковой обработки было невозможно, поскольку это привело бы к увеличению частиц в размерах, поэтому далее СаР-частицы с включенной СОД1 получали по методике Б – с охлаждением (Табл. 14). В этих условиях пенообразования не наблюдалось. Даже в этом случае при попытке изучить характеристики непокрытых частиц с СОД1, они довольно быстро разрушались при центрифугировании (п.2.2.4., 2.2.11). Таким образом, после получения СаР-частиц в присутствии СОД1 их сразу же покрывали 5 кДа хитозаном для повышения стабильности (Табл. 29).

Табл. 29. Характеристики гибридных частиц с включенной СОД1.

Образец	СаР/СОД1/5 кДа хитозан	СаР/СОД1/ целлобиоза [55]
d, нм	170±20	460±30
PDI	0,47	-
ζ, мВ	+22±1	-14±2
% включения СОД1	64±3	50±5
Содержание СОД1, мкг/мг	110±5	-
Активность СОД1 в частицах, kU/мг	6±0,2	-
Активность СОД1 в суспензии, kU/мл	9,3±0,3	-

Ранее уже были получены СаР-частицы, содержащие СОД1, однако производили покрытие не хитозаном, а целлобиозой [55]. В целом, процент включения СОД1 в СаР-частицы, покрытые и 5 кДа хитозаном, и целлобиозой оказался схож, хотя в случае покрытых хитозаном частиц эффективность включения оказалась несколько выше. Включение СОД1 в покрытые целлобиозой СаР-частицы вызывало повышение ζ-потенциала с -16 до -4 мВ [55], как и в покрытые хитозаном – с +12 до +22 мВ, то есть примерно на 10 мВ. Несмотря на то, что при значениях рН в системе СОД1 несла суммарный отрицательный заряд, так как ее изоэлектрическая точка составляет 4,5; возможно, СОД1 взаимодействовала с ионами кальция при синтезе СаР-частиц, что нивелировало отрицательные заряды поверхности частиц по сравнению с частицами, не содержащими СОД1.

Таким образом, удалось получить СаР-частицы, покрытые 5 кДа хитозаном и содержащие СОД1. Частицы характеризовались гидродинамическим диаметром 170 ± 20 нм, высоким положительным ζ-потенциалом $+22 \pm 1$ мВ, а также высоким процентом включения препарата, что являлось подходящим для использования частиц в офтальмологии.

3.5.2.3. Высвобождение СОД1 из гибридных частиц

Зависимость высвобождения СОД1 из покрытых хитозаном СаР-частиц от времени представляла собой кривую с двумя участками (Рис. 29): за первые 5 минут вымывалось 30% СОД1. Предположительно, 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.

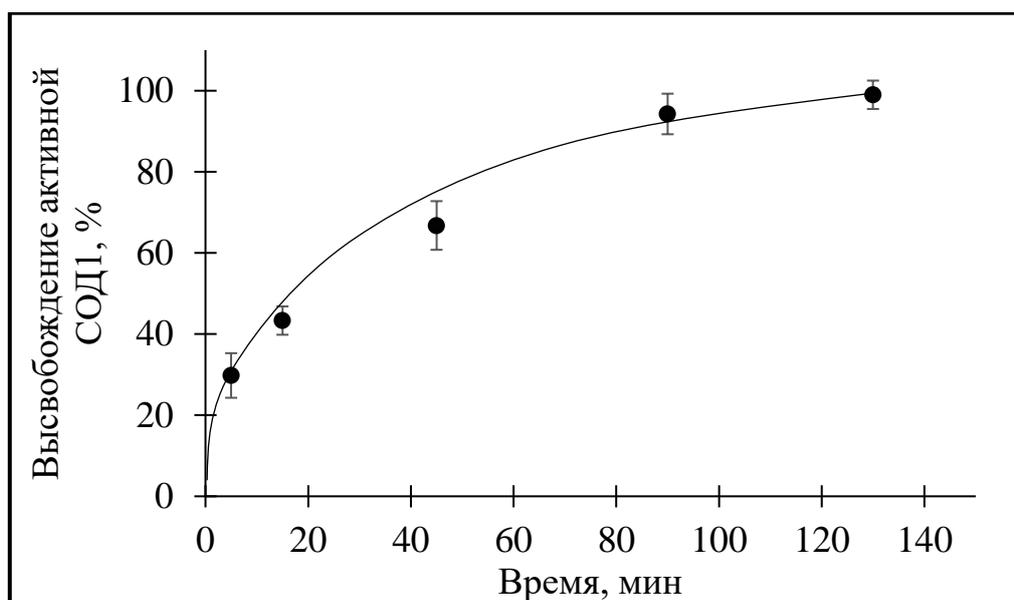


Рис. 29. Кинетика высвобождения СОД1 из покрытых 5 кДа хитозаном СаР-частиц при инкубации в физиологическом растворе.

При сравнении профиля высвобождения СОД1 из СаР-частиц, покрытых 5 кДа хитозаном и целлобиозой [55], оказалось, что кинетика высвобождения принципиально разная: из покрытых хитозаном частиц СОД1 высвобождалась во времени практически до 100% за 2 часа. В то же время из покрытых целлобиозой частиц СОД1 достигала равновесия с элюирующим раствором гораздо быстрее – за 30 минут при 25% высвобождения, и дальнейшая десорбция СОД1 была возможна только при смене элюента [55].

В табл. 30 приведены данные по аппроксимации данных о высвобождении СОД1 из гибридных частиц на основе фосфата кальция и 5 кДа хитозана с помощью различных моделей (Табл. 7). Наиболее удовлетворяющей моделью является модель Корсмейера-Пеппаса. Значения коэффициента «n» соответствовало фиковской диффузии.

Табл. 30. Аппроксимация данных высвобождения включенной СОД1 с использованием различных математических моделей.

Модель	Корсмейер-Пеппас			Хигучи		Первый порядок		Хиксон-Кроуэлл	
	К	n	R ²	К	R ²	К	R ²	К	R ²
СаР/5 кДа хитозан/СОД1	0,39	0,34	0,99	$9,6 \cdot 10^{-2}$	0,98	$1,26 \cdot 10^{-2}$	0,92	$2,97 \cdot 10^{-3}$	0,98

3.3.2.4. Стабильность гибридных частиц с включенной супероксиддисмутазой 1.

CaP-частицы, покрытые 5 кДа хитозаном и содержащие СОД1, были стабильны при хранении в суспензии при 4°C по крайней мере в течение 3 недель (Табл. 31). Однако, по сравнению с гибридными частицами с включенным эналаприлатом (Табл. 27), частицы, содержащие СОД1, были менее стабильны. Стабильность частиц удалось повысить с помощью покрытия 5 кДа хитозаном.

В течение 1 недели следили за активностью СОД1 в растворе и в составе частиц. При хранении в растворе уже через 7 дней СОД1 практически полностью теряла свою активность. За это время СОД1 в составе гибридных частиц сохраняла свою активность.

Табл. 31. Характеристики CaP-частиц, покрытых 5 кДа хитозаном и содержащих СОД1, при хранении при 4°C в суспензии.

Время хранения	Характеристики	
исходные	d, нм	170±30
	PDI	0,35
	ζ, мВ	+21±2
1 неделя	d, нм	170±20
	PDI	0,39
	ζ, мВ	+21±1
2 недели	d, нм	180±30
	ζ, мВ	+20±2
	PDI	0,35
3 недели	d, нм	210±15
	ζ, мВ	+18±2
	PDI	0,42
1 месяц	d, нм	250±30
	ζ, мВ	+14±3
	PDI	0,51

3.5.2.5. СаР-частицы с СОД1, покрытые 5 кДа хитозаном, в экспериментах *in vivo*

А) Сравнение эффективности удерживания СОД1 в слезной жидкости в составе гибридных частиц или в форме раствора.

Начальное удаление СОД1 из слезной жидкости оказалось очень быстрым. Поскольку базальный объем слезы (около 7-8 мкл [38]) значительно меньше объема капли (50 мкл), излишки закапываемого препарата немедленно стекали с поверхности глаза, а оставшийся объем капли разбавлялся слезой. Несмотря на то, что данные недостаточно достоверны ввиду значительных погрешностей измерений при работе с экспериментальными животными, СОД1 обнаруживалась в слезной жидкости после инстилляций как в составе частиц, так и в форме раствора. Активность СОД1, закапываемой в виде суспензии гибридных частиц, в слезе оказалась выше через 10 минут после закапывания, чем активность СОД1, закапываемой в виде раствора СОД1 (Рис. 30). Также мы обнаружили некоторую активность СОД1 в слезной жидкости даже через полчаса после закапывания суспензии гибридных частиц, содержащих СОД1, в то время как свободная СОД1 к этому времени, по-видимому, полностью вымывалась (Рис. 30). Через час активность СОД1 возвращалась к уровню активности эндогенной СОД1.

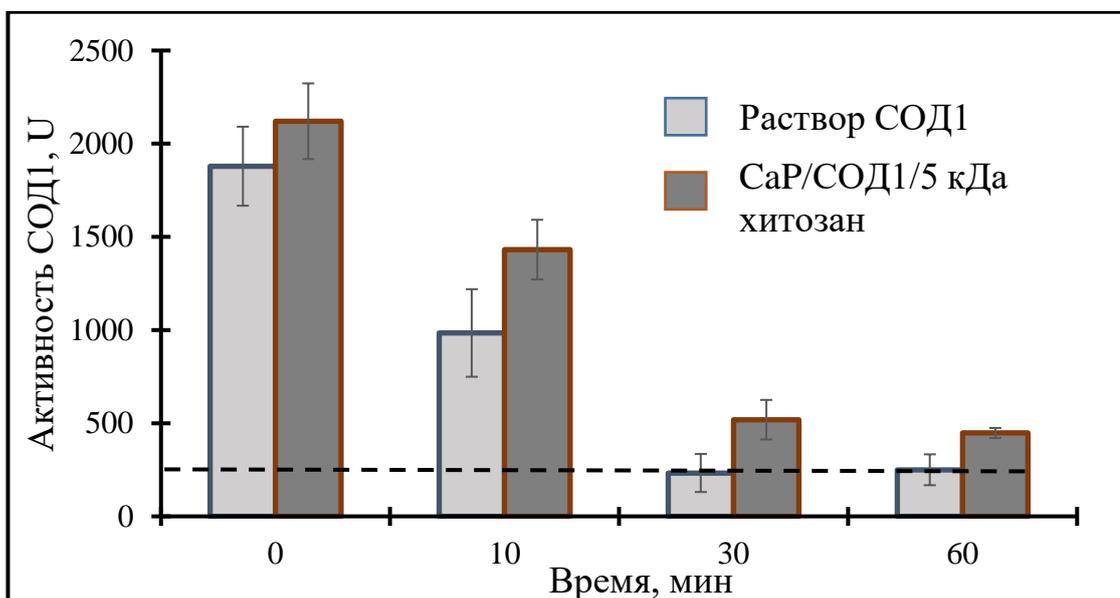


Рис. 30. Удерживание в слезе кроликов СОД1 в форме раствора и в составе покрытых 5 кДа хитозаном СаР-частиц (прерывистая линия – уровень активности эндогенной СОД1).

Таким образом, включение СОД1 в покрытые хитозаном СаР-наночастицы способствовало увеличению времени удерживания СОД1 в слезной жидкости, как и в случае эналаприлата.

Б) Исследование влияния СОД1 в составе частиц или в растворе на ВГД

Известно, что повышенное внутриглазное давление может вызывать окислительный стресс – накопление активных форм кислорода, способных повреждать клетки сетчатки, вызывая их апоптоз [144]. При этом, было показано, что активность СОД1 значительно снижается при повышенном ВГД [247]. Таким образом, введение экзогенной СОД1 имеет антиоксидантное и цитопротекторное действие и приводит к снижению ВГД [216].

Для изучения влияния включения СОД1 в гибридные частицы на ВГД использовали суспензию покрытых 5 кДа хитозаном СаР-частиц с СОД1, а также контрольный раствор СОД1 с идентичной концентрацией (12 кроликов – 24 глаза). Показано, что применение СОД1 как в форме раствора, так и в составе гибридных частиц приводило к падению ВГД уже спустя 1 час после закапывания (Рис. 31). Падение ВГД и для препарата в частицах, и в форме раствора, происходило синхронно, однако уже на третьем часу после инстилляций раствора СОД1 значения ВГД возвращались к исходному, а давление у кроликов, которым инстиллировали СОД1 в частицах, оставалось сниженным вплоть до 6 часов. Различия значений изменения ВГД между раствором СОД1 и СОД1 в покрытых СаР-частицах статистически достоверны уже на 3 часу после инстилляций.

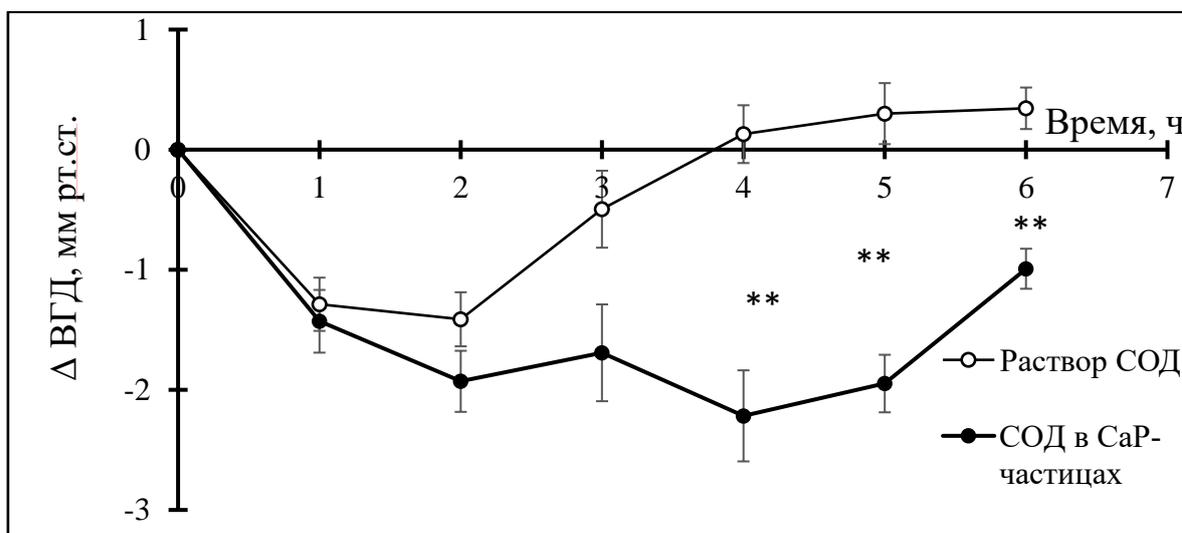


Рис. 31. Снижение ВГД у кроликов после однократной инстилляций СОД1 в СаР-частицах, покрытых 5 кДа хитозаном и СОД1 в водной форме. Области значений U-критерия Манна-Уитни: ** – $U_{эмп} \leq U_{0,01}$ (различия между значениями падения ВГД достоверны).

Таким образом, включение СОД1 в гибридные частицы на основе фосфата кальция и 5 кДа хитозана позволило значительно пролонгировать ее действие по снижению ВГД по сравнению с раствором СОД1.

3.5.3. CaP-частицы с совместно включенными СОД1 и эналаприлатом

Таким образом, мы показали, что включение эналаприлата и СОД1 в гибридные частицы способствовало усилению их действия по снижению ВГД. Поэтому представляло интерес провести совместное включение препаратов в CaP-частицы с хитозановым покрытием.

3.5.3.1. Взаимное влияние СОД1 и эналаприлата

Перед совместным включением препаратов в частицы необходимо было исследовать их взаимное влияние. Для этого проводилась оценка активности каждого из соединений в присутствии другого, находящегося в концентрации, соответствующей его содержанию в суспензии получаемых частиц или превышающей ее.

Было продемонстрировано, что СОД1 с концентрацией 0,3 мг/мл, значение которой превышает концентрацию в суспензии гибридных частиц, не влияла на ингибирующее действие эналаприлата на активность АПФ. Также мы показали, что эналаприлат с концентрацией 3,6 мМ в растворе СОД1 не влиял на активность СОД1, которую определяли по ингибированию реакции автоокисления кверцетина.

Таким образом, мы продемонстрировали, что совместное включение препаратов в покрытые хитозаном CaP-частицы не сказывалось на их активности.

3.3.3.2. Совместное включение СОД1 и эналаприлата в гибридные частицы

Включение препаратов в частицы проводили методом соосаждения при ультразвуковой обработке при охлаждении в условиях включения СОД1 (по методике Б – Табл. 7). Растворяли необходимое количество эналаприлата и СОД1 в растворе гидрофосфата калия и проводили синтез CaP-частиц. Затем частицы сразу же покрывали 5 кДа хитозаном для повышения их стабильности.

Полученные частицы анализировали методом динамического светорассеяния, который показал, что гидродинамический диаметр частиц незначительно меньше (140 нм) по сравнению с частицами с включенной СОД1 (170 нм). Высокий поверхностный заряд полученных частиц +20 мВ свидетельствовал об эффективном покрытии частиц хитозаном, при этом он был примерно равен с ζ -потенциалом покрытых частиц, в которые включена только СОД1 (Табл. 29).

Также был определен процент включения препаратов в покрытые хитозаном CaP-частицы. При совместном включении эффективность включения СОД1 сократилось с 64% (Табл. 35, частицы с включенной СОД1) до 30%. Эффективность включения эналаприлата

оказалась выше и составила 56%, что могло объясняться наличием отрицательно заряженных карбоксильных групп эналаприлата, взаимодействующих как с ионами кальция на стадии получения частиц, так и с протонированными аминогруппами хитозана при покрытии. По-видимому, включение эналаприлата более предпочтительно, поэтому сократилось содержание СОД1.

Сравнение полученных результатов с характеристиками СаР-частиц с включенным эналаприлатом, покрытых 5 кДа хитозаном, показало, что совместное включение препаратов приводило к уменьшению размера частиц и повышению ζ -потенциала (Табл. 32)

Табл. 32. Сравнительная характеристика полученных покрытых 5 кДа хитозаном СаР-частиц с включенными препаратами.

Частицы	СаР/СОД1/ 5 кДа хитозан	СаР/СОД1+эналаприлат/ 5 кДа хитозан	СаР/Эналаприлат/ 5 кДа хитозан
d, нм	170 ± 20	140 ± 20	180 ± 30
PDI	0,47	0,43	0,25
ζ , мВ	+22 ± 1	+20 ± 1	+7 ± 3
% включения СОД1	64 ± 3	30 ± 2	–
Содержание СОД1, мкг/мг	110±5	40±3	–
Активность СОД1 в частицах, kU/мг	6±0,2	2,8±0,3	–
Активность СОД1 в суспензии, kU/мл	9,3±0,3	9,2±0,4	–
% включения эналаприлата	–	56 ± 6	66 ± 5
Содержание эналаприлата, мкг/мг	–	300±20	340±20

Несмотря на то, что включение эналаприлата приводило к уменьшению ζ -потенциала по сравнению с пустыми СаР-частицами, покрытыми 5 кДа хитозаном, оно практически не повлияло на ζ -потенциал частиц с включенной СОД1. СОД1 – фермент белковой природы и несет на себе множество поверхностных зарядов, поэтому, возможно, она нивелирует вклад карбоксильных групп эналаприлата в ζ -потенциал получаемых частиц.

В итоге, в CaP-частицы, покрытые 5 кДа хитозаном, удалось включить два препарата различной природы – высокомолекулярный фермент СОД1 (32,5 кДа) и низкомолекулярный ингибитор АПФ эналаприлат (348 Да) с высокой эффективностью – $30\pm 2\%$ и $56\pm 6\%$ соответственно.

3.5.3.3. Изучение СОД1 и эналаприлата в составе CaP- и гибридных частиц методом ИК-спектроскопии

Для идентификации СОД1, эналаприлата и 5 кДа хитозана в составе частиц были получены их индивидуальные ИК-спектры в той же концентрации, в которой они присутствовали в составе частиц.

ИК-спектр совместно включенных СОД1 и эналаприлата в CaP- и гибридные частицы демонстрировал присутствие всех препаратов — СОД1 и эналаприлата в составе частиц (Рис. 32). Включение СОД1 и эналаприлата в CaP-частицы и гибридные частицы приводило к значительному увеличению интенсивности в областях $1700-1600\text{ см}^{-1}$ и $1600-1500\text{ см}^{-1}$, что можно отнести к диапазону колебаний амида I и амида II СОД1, и колебаниям ароматической структуры эналаприлата (Рис. 32А, Б, В). Кроме того, о включении препаратов в гибридные и CaP-частицы свидетельствовало также повышение интенсивности в области $1415-1375\text{ см}^{-1}$, что можно отнести к колебаниям ароматических колец СОД1 и эналаприлата.

Таким образом, исследование ИК-Фурье-спектров продемонстрировало, что СОД1 и эналаприлат присутствуют как в непокрытых CaP-частицах, так и в составе CaP-частиц, покрытых 5 кДа хитозаном.

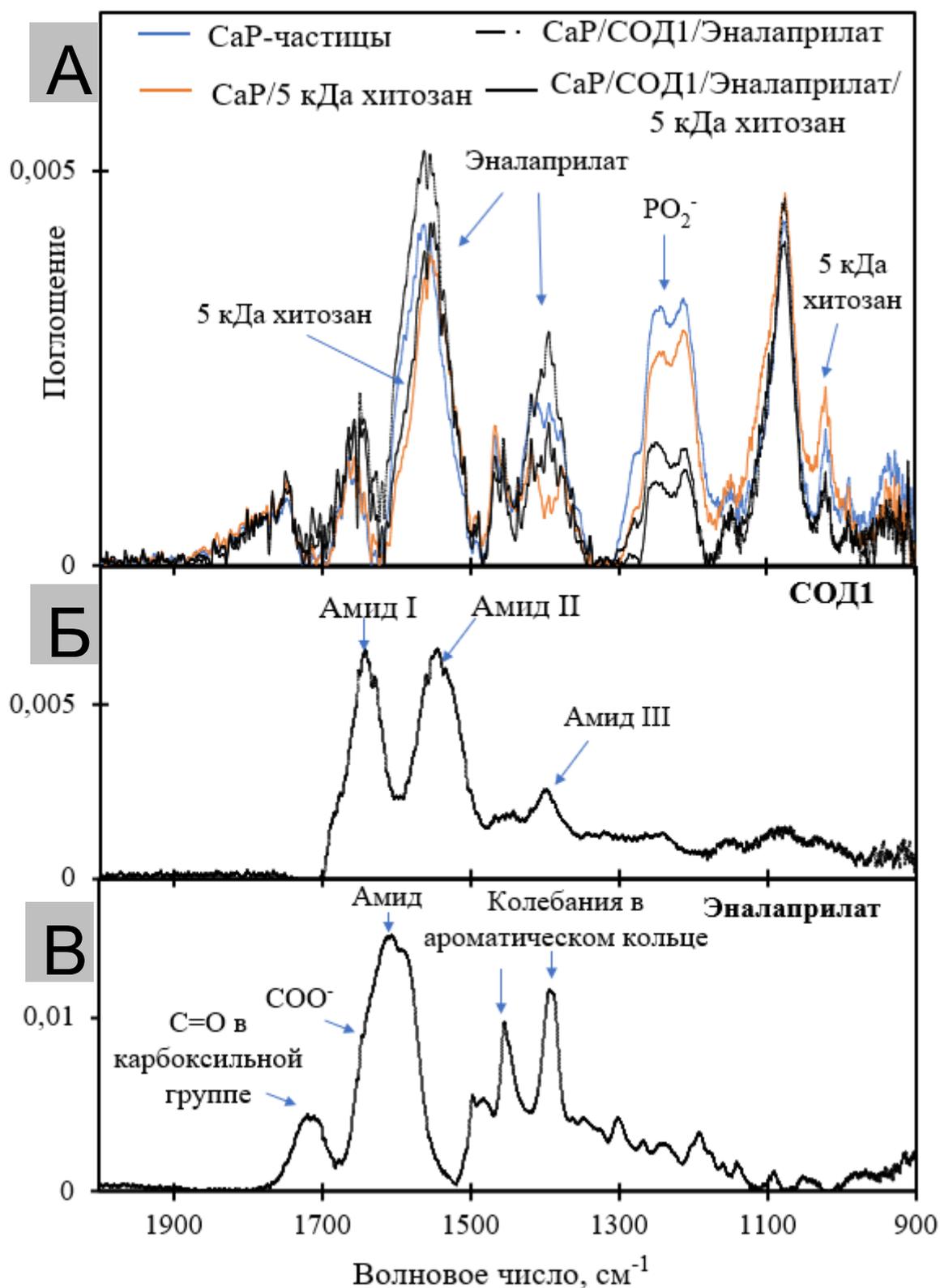


Рис. 32. Спектры, полученные методом ИК-Фурье спектроскопии, А) CaP-частиц (синий), пустых гибридных частиц (оранжевый); CaP -частиц с совместно включенными СОД₁ и эналаприлатом (зеленый); гибридных частиц с совместно включенными СОД₁ и эналаприлатом (черный); Б) – СОД₁, В) – эналаприлата.

3.5.3.4. Высвобождение совместно включенных эналаприлата и СОД1 из гибридных частиц

Как уже говорилось ранее, высвобождение препаратов из носителей регулирует их биодоступность и эффективность. Поэтому следующим шагом стало исследование кинетики вымывания совместно включенных СОД1 и эналаприлата из покрытых 5 кДа хитозаном СаР-частиц при инкубации в физиологическом растворе (Рис. 33).

Профиль высвобождения СОД1 имел два участка с разным наклоном кривой. Около 30% СОД1 переходило в раствор достаточно быстро за первые 5 минут, затем высвобождение немного замедлялось и к 45 минутам достигало 60%, как и в случае с десорбцией фермента из частиц, содержащих только СОД1 (Рис. 29). Но последующая десорбция препарата значительно замедлялась. Если в случае отдельно включенной СОД1 100%-ное вымывание происходило за 130 минут, то при совместном включении СОД1 удерживалась в частицах дольше вплоть до достижения равновесия через 180 минут, когда процент высвобождения составлял 90%.

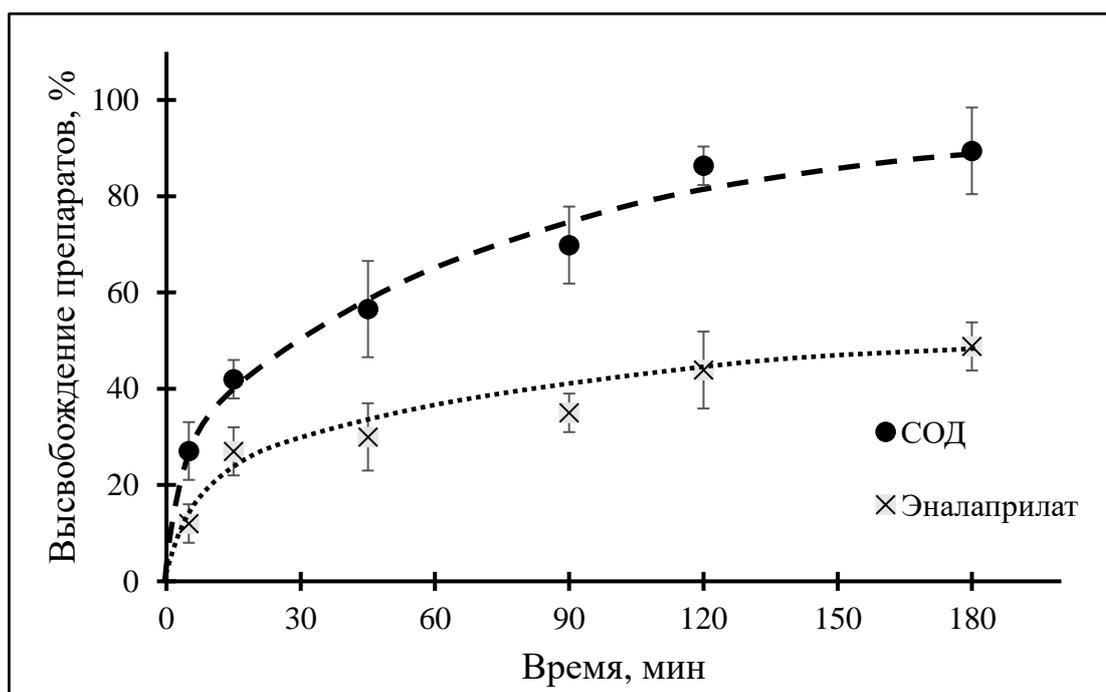


Рис. 33 Кинетика вымывания СОД1 и эналаприлата, включенных в покрытые 5 кДа хитозаном СаР-частицы при инкубации в физиологическом растворе.

Эналаприлат лучше удерживался в частицах по сравнению с СОД1, плавно вымываясь из частиц и достигая состояния равновесия при проценте высвобождения 48%, что хорошо коррелирует с ранее полученными данными (Рис. 23). Более медленное

высвобождение СОД1 при совместном включении может быть связано с меньшей эффективностью включения (Табл. 30).

При аппроксимации данных по высвобождению с помощью математических моделей было показано, что высвобождение совместно включенных в гибридные частицы СОД1 и эналаприлата описывалось моделью Корсмейера-Пеппаса (Табл. 33). Это совпадало с высвобождением препаратов из частиц, включенных по отдельности (Табл. 26, 30). Константа «К» характеризует скорость высвобождения препарата: значение «К», определенное для эналаприлата при отдельном и совместном с СОД1 включении, практически одинаково, в то время как для СОД1, включенной отдельно или совместно, значение отличается в два раза (0,34 против 0,17). Для СОД1 параметр «n» совпадал как для совместно включенных частиц, так и просто для частиц с СОД1; а для эналаприлата значение «n» уменьшалось, и в случае совместно включенных препаратов, соответствовал фиктивной диффузии для обоих включенных веществ.

Табл. 33. Аппроксимация данных с использованием различных математических моделей высвобождения включенных препаратов.

Модель		Корсмейер-Пеппас			Хигучи		Первый порядок		Хиксон-Кроуэлл	
Образец	Препарат	К	n	R ²	К	R ²	К	R ²	К	R ²
СаР/ 5 кДа хитозан	Эналаприлат	$6,5 \cdot 10^{-2}$	0,39	0,99	$3 \cdot 10^{-2}$	0,93	$5,2 \cdot 10^{-3}$	0,62	$4,6 \cdot 10^{-4}$	0,78
	СОД1	0,17	0,32	0,99	$5,6 \cdot 10^{-2}$	0,97	$5,4 \cdot 10^{-3}$	0,82	$9,7 \cdot 10^{-4}$	0,92

3.5.3.5. Стабильность частиц с совместно включенными препаратами

Частицы с включенной СОД1 и с совместно включенными препаратами имели схожую стабильность (Табл. 31, 34). В течение трех недель размер и ζ -потенциал частиц были практически неизменны, затем происходило увеличение размера и падение потенциала поверхности. В целом, стабильность характеристик как гибридных частиц с отдельно включенной СОД1, так и с совместно включенными препаратами, при хранении в растворе примерно одинакова (Табл. 28). Понижение стабильности гибридных частиц с совместно включенными препаратами по сравнению с частицами, содержащими только

эналаприлат, по-видимому, также связано с использованием большей концентрации стабилизирующего агента и образованием более лабильной суспензии. При этом, следует отметить, что частицы с эналаприлатом были получены по методике А – без охлаждения, а с СОД1 и с совместно включенными СОД1 и эналаприлатом – по методике Б – с охлаждением.

Так же, как и в случае одиночно включенной СОД1, сохранение активности СОД1 изучали в течение 1 недели. Оказалось, за 1 неделю активность СОД1 в составе гибридных частиц снижалась на 5-7% (с 9,3 кУ/мл до 8,9 кУ/мл), однако активность СОД1 в растворе уменьшалась практически до 0. По-видимому, несколько меньшая стабильность сохранения активности СОД1 в составе гибридных частиц с совместно включенными препаратами была следствием меньшей эффективности включения СОД1 в состав частиц.

Табл. 37. Характеристики CaP-частиц, покрытых 5 кДа хитозаном и содержащих совместно включенные эналаприлат и СОД1, при хранении при 4°C в растворе после синтеза.

Время хранения	Характеристики	
исходные	d, нм	140±20
	ζ, мВ	+19±1
	PDI	0,18
1 неделя	d, нм	170±15
	ζ, мВ	+19±2
	PDI	0,21
2 недели	d, нм	200±20
	ζ, мВ	+17±1
	PDI	0,22
3 недели	d, нм	200±30
	ζ, мВ	+14±2
	PDI	0,32
1 месяц	d, нм	240±30
	ζ, мВ	+12±2
	PDI	0,4

Несмотря на включение СОД1 в гибридные частицы, их стабильность уменьшалась незначительно, таким образом, хитозановое покрытие способствует увеличению стабильности суспензии.

3.5.3.6. CaP-частицы, содержащие совместно включенные СОД1 и эналаприлат и покрытые 5 кДа хитозаном, в экспериментах *in vivo*

В экспериментах по сравнению гипотензивного действия эналаприлата, СОД1 и совместно включенных препаратов в растворе и в составе CaP-частиц, покрытых 5 кДа хитозаном, (по 12 кроликов – 24 глаза) (Рис. 34). Концентрация эналаприлата в суспензии составляла 2,2 мМ или 0,78 мг/мл, а активность СОД1 9300 U/мл. Суспензии частиц не очищали от несвязавшихся компонентов системы после синтеза.

Инстилляции СОД1 в растворе приводили к снижению ВГД в течение 3 часов. На четвертом часу давление возвращалось к исходному значению, в то время как эналаприлат в растворе достоверно снижал давление до 4 часов (Рис. 34А). При этом, совместное введение препаратов приводило к несколько более глубокому снижению ВГД.

При инстилляции совместно включенных препаратов в частицах происходило резкое падение ВГД практически на 3,5 мм рт.ст. через час после закапывания. При этом, падение ВГД при использовании отдельно включенных в гибридные частицы СОД1 и эналаприлата приводило к падению на 1,4 и 0,8 мм рт.ст соответственно. Хотя, даже если бы можно было суммировать эффекты частиц, содержащих СОД1, и частиц, содержащих эналаприлат, сумма не превышала бы 2,2 мм рт. ст. (Рис. 34 Б, В). Таким образом, в первый час после инстилляции совместно включенные СОД1 и эналаприлат в составе гибридных частиц оказывали некоторый синергический эффект на ВГД, который, по-видимому, обусловлен различными физиологическими механизмами действия СОД1 и эналаприлата. В то время как эналаприлат должен был высвобождаться из частиц, чтобы достичь своей цели (АПФ) в тканях глаза, СОД1 могла действовать как при высвобождении из частиц, так и во время пребывания в них, поскольку низкомолекулярные активные формы кислорода могли проникать в частицы. По-видимому, в первый час именно СОД1 могла вносить основной вклад в снижение ВГД. На втором часу синергизм исчез, но влияние гибридных частиц с СОД1 и эналаприлатом на внутриглазное давление все еще было заметным и статистически значимым как по сравнению с препаратами в растворе, так и в составе CaP-частиц. Более того, статистически более выраженный эффект СОД1/эналаприлата в составе гибридных частиц на ВГД сохранялся даже через 6 часов после закапывания.

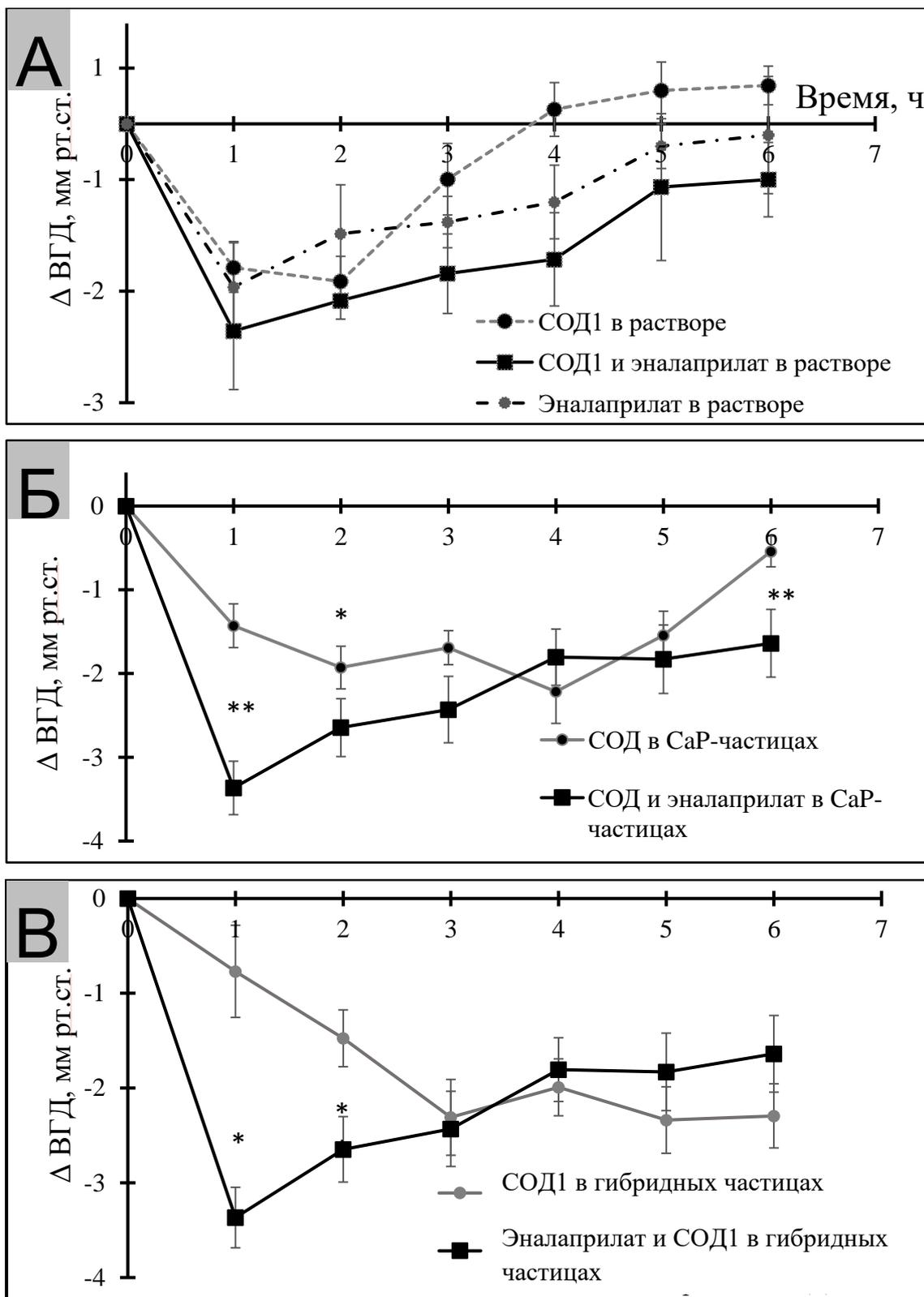


Рис. 34. Снижение ВГД у кроликов после однократной инстилляцией А) растворов СОД1, эналаприлата и препаратов вместе; Б и В – совместно включенных эналаприлата и СОД1 в СаР-частицах, покрытых 5 кДа хитозаном и Б) СОД1 в СаР-частицах, покрытых 5 кДа хитозаном, В) Эналаприлата в СаР-частицах, покрытых 5 кДа хитозаном. Области значений U-критерия Манна-Уитни: * – $U_{эмп} \leq U_{0,05}$, ** – $U_{эмп} \leq U_{0,01}$ (различия между значениями падения ВГД достоверны).

Таким образом, совместно включенные в гибридные частицы СОД1 и эналаприлат обладали синергическим действием по снижению ВГД, поскольку гипотензивный эффект при введении частиц с совместно включенными препаратами превышал эффект при введении отдельно включенных в частицы препаратов. Возможно, это связано с различными механизмами действия СОД1 и эналаприлата на величины внутриглазного давления.

3.6. Хитозановые частицы, содержащие эналаприлат

Поскольку мы показали, что применение в эналаприлата в составе гибридных частиц приводило к более сильному гипотензивному эффекту, чем в составе СаР-частиц, решили проверить, может ли использование эналаприлата в составе хитозановых частиц вызвать схожее действие в экспериментах *in vivo*. Для их получения мы использовали метод ионотропного гелеобразования с помощью ТПФ, как и в случае с покрытием СаР-частиц. При попытке получить хитозановые частицы с включенным эналаприлатом при концентрации хитозана, равной концентрации хитозана при покрытии (0,3 мг/мл), система оказалась нестабильной. Таким образом, было необходимо подобрать условия для получения более стабильных хитозановых частиц.

3.6.1. Подбор условий получения хитозановых частиц

А) Подбор условий синтеза 5 кДа хитозановых частиц

Для подбора условий синтеза частиц на основе 5 кДа хитозана с оптимальным размером и ζ -потенциалом, мы варьировали рН среды на основе данных по растворимости хитозана и соотношению хитозана и сшивающего агента ТПФ (Табл. 35) при фиксированной концентрации хитозана 1 мг/мл.

При проведении синтеза хитозановых частиц при рН 6,0 основная масса хитозана выпадала в осадок, помимо этого образовывалось несколько фракций частиц, чему соответствовало высокое значение индекса полидисперности (PDI). При рН 5,0, удалось получить одну фракцию частиц со средним гидродинамическим диаметром около 100 нм (Табл. 35). Поверхностный заряд частиц чрезвычайно сильно зависел от соотношения ТПФ:хитозан. При высоком соотношении хитозана и сшивающего агента ζ -потенциал частиц был практически нулевым, что, возможно, связано с большим числом сшивок между хитозаном и ТПФ и экранированием аминогрупп хитозана. Снижение концентрации ТПФ привело к получению частиц с более высоким ζ -потенциалом (Табл. 38). Таким образом, в

качестве оптимальных условий для получения частиц с наиболее высоким ζ -потенциалом были выбраны pH 5,0 и соотношение ТПФ:хитозан=0,2:1.

Табл. 35. Характеристики хитозановых частиц, образованных 5 кДа хитозаном.

ТПФ:хитозан	Соотношение NH ₂ /P	pH 5,0			pH 6,0		
		d, нм	PDI	ζ , мВ	d, нм	PDI	ζ , мВ
0,25:1	7,5	80±10	0,26	+3±2	50±10	0,723	0±2
0,2:1	9	110±20	0,2	+23±2	660±200	0,9	+5±2
0,15:1	12,5	100±50	0,3	+20±2	35±10	0,95	+3±2

Б) Подбор условий синтеза гликоль-хитозановых частиц

Для подбора условий получения частиц на основе 72 кДа гликоль-хитозана, мы варьировали концентрацию хитозана (1, 1,5 и 2 мг/мл) и соотношение ТПФ:хитозан при различных pH (6,3-7,8). Во всем исследованном диапазоне pH оптимальным значением было 7,1 при используемой концентрации гликоль-хитозана 2 мг/мл. Оптимальное соотношение ТПФ:хитозан=0,2:1 позволило получить частицы с наиболее подходящими характеристиками для последующего применения в качестве носителей (Табл. 36).

Табл. 36. Характеристики хитозановых частиц, образованных гликоль-хитозаном.

ТПФ:хитозан	Соотношение NH ₂ /P	pH 7,1		
		d, nm	PDI	ζ , mV
0,2:1	9,5	250±10	0,19	+19±2
0,15:1	12,5	180±30	0,46	+11±2
0,1:1	18,5	40±30	0,8	+3±2

В) Сравнение характеристик хитозановых и покрытых хитозаном CaP-частиц

Как синтез хитозановых частиц, так и покрытие кальций-фосфатных хитозаном, осуществляли методом ионотропного гелеобразования, используя в качестве сшивающего агента ТПФ. В целом, и покрытие, и синтез проводили в схожих условиях: для 5 кДа хитозана pH при синтезе частиц 5,0; pH при покрытии – 5,7. Для гликоль-хитозана – 6,8 и 7,1 соответственно. Соотношение ТПФ:хитозан во всех случаях было одинаково и составляло 0,2:1.

Как видно из табл. 15, 35., у частиц, образованных 5 кДа хитозаном, ζ -потенциал значительно выше, чем у покрытых им же СаР-частиц. Это связано с тем, что сами СаР-частицы обладают отрицательным поверхностным зарядом (-25 мВ). При этом, гидродинамический диаметр покрытых 5 кДа хитозаном частиц был больше, чем у образованных хитозаном, что, по-видимому, также связано с размером неорганического кора.

В то же время, гидродинамический диаметр и ζ -потенциал гликоль-хитозановых и гибридных частиц практически не отличаются (Табл. 16, 36). По-видимому, в отличие от 5 кДа хитозана, размер цепей гликоль-хитозана достаточно велик, чтобы, во-первых, образовать частицы схожего с гибридными диаметром, а, во-вторых, нивелировать отрицательный ζ -потенциал СаР-частиц.

3.6.2. Исследование морфологии хитозановых частиц

Методом РЭМ были получены снимки 5 кДа и гликоль-хитозановых частиц. Как видно на рис. 35, и 5 кДа хитозановые, и гликоль-хитозановые частицы имели сферическую форму. Концентрация 5 кДа хитозановых частиц на подложке была меньше, чем гликоль-хитозановых, что, по-видимому, было связано с более высокой концентрацией гликоль-хитозана при синтезе.

Размер 5 кДа хитозановых частиц, полученный при изучении методом РЭМ, варьировался от 50 до 160 нм, в среднем составляя около 77 ± 30 нм, что согласовывалось с гидродинамическим диаметром, определенным методом динамического светорассеяния. В случае гликоль-хитозана размер на снимках варьировался от 60 до 250 нм со средним значением 160 ± 40 нм. Оба значения средних размеров хитозановых частиц, полученных методом РЭМ, были меньше, чем полученные методом ДСР значения гидродинамического диаметра (Табл. 35, 36). Нередко данные по размеру, полученные методом ДСР, имеют большие значения, чем полученные с помощью микроскопии. Это может быть связано с тем, что измеряемый ДСР гидродинамический диаметр включает в себя размер не только самой частицы, но и некоторые из окружающих молекул диспергирующей среды, что означает, что гидродинамический диаметр всегда немного больше, чем фактический диаметр частицы.

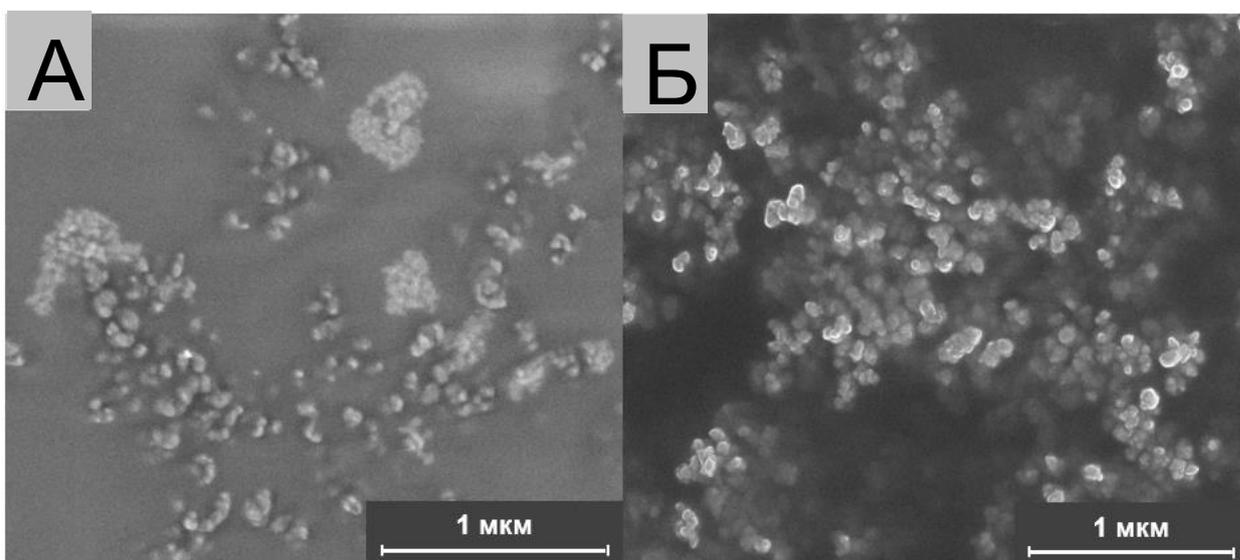


Рис. 35. Снимки, полученные методом РЭМ, для хитозановых частиц, образованных 5 кДа хитозаном (А), гликоль-хитозаном (Б)

3.6.3. Эффективность образования хитозановых частиц и покрытия CaP-частиц

Эффективность образования хитозановых частиц оценивали как долю хитозана, образовавшего частицы, к общему внесённому хитозану. Как видно из табл. 37, практически весь 5 кДа хитозан и 75% внесённого гликоль-хитозана образовывали частицы.

Табл. 37. Эффективность образования хитозановых частиц и покрытия CaP-частиц

Частицы	Хитозан	Эффективность образования, %
Хитозановые	5 кДа хитозан	92±5
	Гликоль-хитозан	75±7
Гибридные	5 кДа хитозан	13±2
	Гликоль-хитозан	45±1

В целом, эффективность образования хитозановых частиц была выше, чем эффективность покрытия, что, по-видимому, связано с различием условий получения хитозановых и гибридных частиц (Табл. 15, 16). Хитозан с молекулярной массой 5 кДа практически полностью (92%) шел на образование хитозановых частиц, однако для покрытия использовалось только 13% внесённого в систему хитозана. По-видимому, это связано с рН системы: хитозан – катионный полимер, поэтому его растворимость повышается с увеличением кислотности среды [10]. Поскольку рН синтеза хитозановых частиц был ниже, чем рН покрытия (Табл. 15, 35), меньше хитозана выпадало в осадок, образуя частицы. Помимо рН, отличалась и концентрация хитозана при получении

хитозановых и гибридных частиц: при покрытии обоими видами хитозана его концентрация составляла около 0,3 мг/мл, для получения 5 кДа хитозановых частиц конечная концентрация хитозана в системе была около 0,8 мг/мл, а для гликоль-хитозановых частиц – около 1,7 мг/мл, что тоже могло влиять на эффективность связывания хитозана в частицы.

В случае гликоль-хитозана сохранялась тенденция более эффективного образования частиц по сравнению с покрытием (Табл. 37), хотя с меньшей разницей. Возможно, это было связано с более высокой растворимостью гликоль-хитозана в условиях как получения хитозановых частиц, так и покрытия кальций-фосфатных.

3.6.4. Включение эналаприлата в хитозановые частицы

Включение эналаприлата осуществлялось на стадии получения хитозановых наночастиц. Процент включения препарата в 5 кДа хитозановые частицы хитозана составил около 25%, при этом включение эналаприлата в частицах не приводило к существенному изменению их характеристик (Табл. 38).

Процент включения эналаприлата в гликоль-хитозановые частицы был более высоким и составлял около 41%. Включение препарата приводило к значительному падению ζ -потенциала частиц и увеличению их среднего гидродинамического диаметра (Табл. 38). По-видимому, эналаприлат за счет наличия карбоксильных групп мог выступать в роли сшивающего агента, обеспечивая координацию хитозановых частиц между собой посредством взаимодействия с аминогруппами хитозана, одновременно снижая поверхностный количество свободных аминогрупп на поверхности частицы и ее поверхностный заряд.

Табл. 38. Сравнительные характеристики пустых хитозановых частиц и частиц, содержащих эналаприлат.

Частицы	Вид хитозана	d, нм	PDI	ζ , мВ	% включения препарата	Содержание препаратов, мкг/мг
Пустые	5 кДа хитозан	110±20	0,2	+23±2	-	-
	Гликоль-хитозан	250±10	0,19	+19±2	-	-
С эналаприлатом	5 кДа хитозан	105±20	0,16	+21±3	25±4	140±30
	Гликоль-хитозан	460±20	0,16	+10±2	41±3	155±45

Сравнение содержания препарата в хитозановых частицах показало, что несмотря на более высокий процент включения в гликоль-хитозановые частицы, содержание препаратов на 1 мг частиц было примерно одинаковым (Табл. 38). По-видимому, емкость хитозана по отношению к эналаприлату примерно одинакова вне зависимости от вида хитозана.

Сравнение с гибридными частицами

Для 5 кДа хитозана при включении эналаприлата происходило небольшое падение ζ -потенциала и увеличение размера в случае СаР-частиц, а для хитозановых частиц эти значения оставались практически неизменными. Однако процент включения эналаприлата в хитозановые частицы был довольно низок (25%) по сравнению с гибридными частицами (66%), что, видимо, и является причиной отсутствия влияния на характеристики хитозановых частиц (Табл. 24, 38). В случае гликоль-хитозана при включении эналаприлата происходило увеличение размера хитозановых частиц, практически вдвое, по-видимому, из-за сшивания с помощью препарата. При этом размер покрытых гликоль-хитозаном СаР-частиц увеличивался незначительно. Процент включения в частицы, образованные гликоль-хитозаном, так же, как и для 5 кДа хитозана был ниже, чем в покрытые хитозаном частицы (Табл. 24, 38).

Таким образом, емкость хитозановых частиц по отношению к эналаприлату меньше, чем у СаР-частиц, поскольку эналаприлат может встраиваться в структуру СаР-частиц и координироваться в порах.

3.6.5. Высвобождение эналаприлата из хитозановых частиц

Первоначальное высвобождение эналаприлата из частиц происходило очень быстро: за 15 минут инкубации из 5 кДа хитозановых частиц высвобождалось около 40% включенного препарата, а из гликоль-хитозановых частиц – около 30% (Рис. 36). Далее высвобождение препарата замедлялось, что, по-видимому, связано с начальной десорбцией эналаприлата с поверхности частиц, в то время как диффузия препарата из внутреннего пространства хитозановых наночастиц была затруднена. При смене элюирующего раствора происходило высвобождение небольшого количества препарата, однако 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 заряженными аминогруппами хитозана.

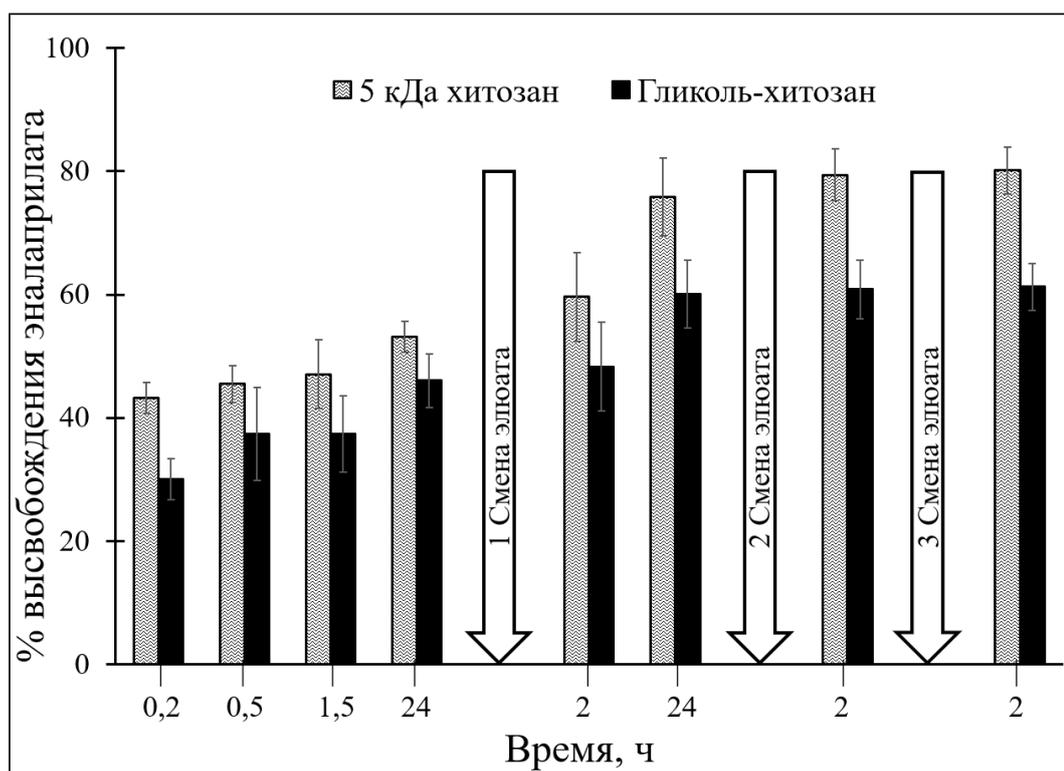


Рис. 36. Кинетика высвобождения эналаприлата из хитозановых частиц при инкубации в физиологическом растворе.

Эналаприлат из гибридных частиц (Рис. 23) высвобождался значительно быстрее, чем из хитозановых (Рис. 36). Разница между кинетикой высвобождения может быть объяснена, во-первых, различной природой частиц: СаР-частицы обладают порами, за счет чего была возможна относительно быстрая диффузия молекул препарата в физраствор, при этом хитозановые частицы, электростатически удерживая эналаприлат, препятствовали его высвобождению. Во-вторых, медленное вымывание могло обуславливаться содержанием препарата в частице: поскольку существует концентрационная зависимость кинетики вымывания препарата, его низкое содержание приводило к более замедленному процессу высвобождения из хитозановых частиц.

Модели кинетики высвобождения эналаприлата из хитозановых частиц

Наиболее подходящей моделью для описания высвобождения препаратов из хитозановых частиц является модель Корсмейера-Пеппаса (Табл. 39). Значение n для хитозановых частиц соответствовала фиковской диффузии, которая относится к процессу переноса препарата, при котором время релаксации полимера намного больше, чем характерное время диффузии растворителя.

Табл. 39. Модели высвобождения эналаприлата из хитозановых частиц

Модель	Корсмейер-Пеппас			Хигучи		Первый порядок		Хиксон-Кроуэлл	
	К	n	R ²	К	R ²	К	R ²	К	R ²
5 кДа хитозан/ Эналаприлат	0,39	0,04	0,99	$4 \cdot 10^{-3}$	0,88	$1,54 \cdot 10^{-4}$	0,89	$1,95 \cdot 10^{-5}$	0,89
Гликоль-хитозан/ Эналаприлат	0,26	0,08	0,90	$4 \cdot 10^{-3}$	0,87	$2,1 \cdot 10^{-4}$	0,68	$2,83 \cdot 10^{-5}$	0,85

Как и в случае гибридных частиц (Табл. 26), высвобождение эналаприлата из хитозановых частиц удовлетворяло модели Корсмейера-Пеппаса. При этом для гибридных частиц была характерна нефиковская диффузия, а для хитозановых частиц – фиковская. Более высокое значение «n» предполагает, что в частицы включено большее количество препарата. И действительно, процент включения эналаприлата в частицы увеличивался от 5 кДа хитозановых частиц (25%) до гибридных покрытых гликоль-хитозаном (72%), равно и как значение «n» увеличивалось от 0,04 до 0,53.

Несмотря на относительно низкий процент включения препарата в хитозановые частицы, высвобождение эналаприлата из частиц происходило длительное время, что могло привести к пролонгированному действию препарата.

3.6.5. Стабильность частиц при хранении

Характеристики пустых 5 кДа хитозановых частиц практически неизменны в течение 2 месяцев при хранении суспензии после синтеза при 4°C (Табл. 40). Однако в случае гликоль-хитозановых частиц стабильность была довольно низкой: 2 недели частицы были стабильны, но за 1 месяц происходило увеличение гидродинамического диаметра в 2,5 раза и примерно двухкратное падение ζ-потенциала. За 1 месяц хранения в суспензии 5 кДа хитозановых частиц с включенным эналаприлатом их характеристики менялись незначительно. Для гликоль-хитозановых частиц в течение 1 месяца после начала хранения частицы незначительно увеличивались в размере.

Табл. 40. Характеристики 5 кДа хитозановых и гликоль-хитозановых частиц при хранении в растворе после синтеза при 4°C.

Время хранения	Характеристики	5 кДа хитозан	5 кДа хитозан/эналалаприлат	Гликоль-хитозан	Гликоль-хитозан/эналалаприлат
исходные	d, нм	110±20	120±20	250±10	410±20
	ζ, мВ	+23±2	+24±1	+19±2	+11±2
	PDI	0,2	0,23	0,19	0,3
1 неделя	d, нм	120±10	140±30	260±50	460±40
	ζ, мВ	+24±2	+29±2	+16±2	+12±3
	PDI	0,19	0,2	0,21	0,35
2 недели	d, нм	120±30	160±20	340±30	370±20
	ζ, мВ	+25±4	+30±2	+14±3	+12±1
	PDI	0,18	0,23	0,29	0,38
3 недели	d, нм	120±10	170±40	570±40	380±30
	ζ, мВ	+25±1	+28±2	+11±2	+14±1
	PDI	0,17	0,23	0,45	0,54
1 месяц	d, нм	120±10	220±20	650±80	630±120
	ζ, мВ	+22±1	+30±2	+11±3	+15±2
	PDI	0,18	0,22	0,51	0,86
2 месяца	d, нм	180±30	-	1500±300	-
	ζ, мВ	+25±2	-	+10±3	-
	PDI	0,19	-	0,83	-

3.6.6. Хитозановые частицы, содержащие включенный эналаприлат, в экспериментах *in vivo*

А) Сравнение эффективности удерживания эналаприлата в слезной жидкости в составе частиц и в форме раствора

После инстилляций эналаприлата в форме раствора за 2 часа препарат полностью вымывался с поверхности глаза и не детектировался в слезе. Тогда как при инстилляциях эналаприлата в составе хитозановых частиц дольше удерживался в слезе и определялся в ней даже через 4 часа после инстилляций суспензии (Рис. 37).

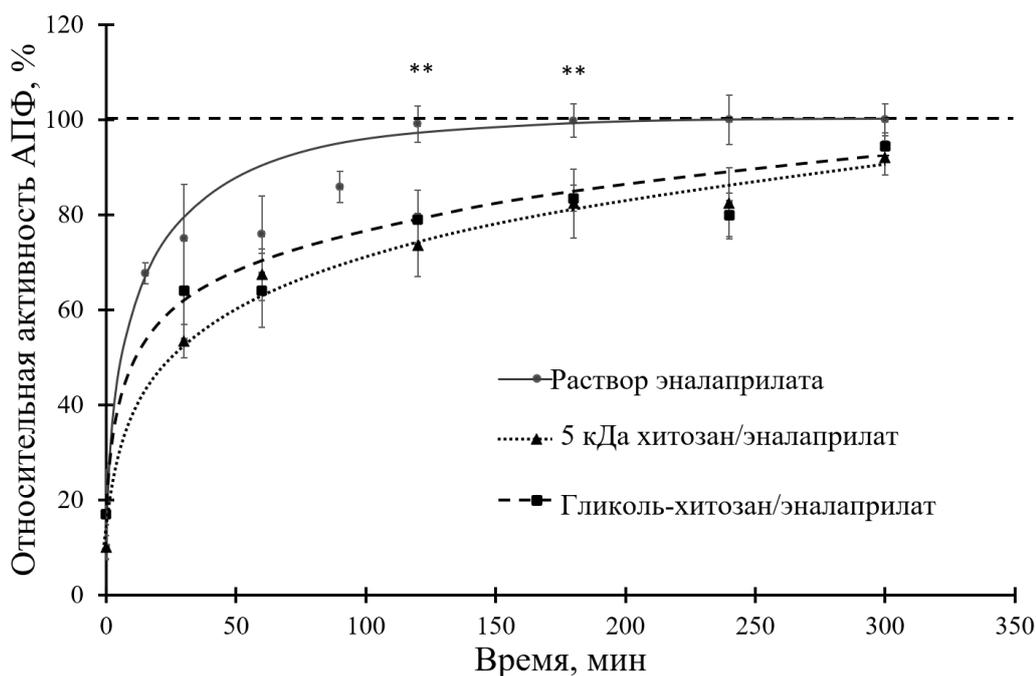


Рис. 37. Удержание эналаприлата в слезной жидкости кроликов после однократной местной инстилляцией препарата.

Сравнение удерживания эналаприлата в слезной жидкости после инстилляций в составе хитозановых и гибридных частиц показало, что кривые ингибирования активности АПФ слезой практически не различались (Рис. 24, 37). По-видимому, увеличение времени нахождения в слезе эналаприлата при инстилляциях в составе частиц любого вида обеспечивалось именно хитозаном. Увеличение времени нахождения эналаприлата в слезной жидкости, по-видимому, обуславливалось взаимодействием аминогрупп хитозанов и остатками сиаловых кислот на поверхности муцинов [10]. Таким образом, хитозановые частицы могли длительное время удерживаться на поверхности глаза, способствуя тем самым пролонгированному удерживанию препарата в слезе.

Б) Сравнительное исследование влияния эналаприлата в составе хитозановых и гибридных частиц на внутриглазное давление

На рисунке 38А, Б представлены усредненные данные, полученные в результате трех серий экспериментов по снижению ВГД при инстилляциях в глаза кроликов эналаприлата в составе суспензии гибридных и хитозановых частиц (в каждой серии использовали 15 кроликов – 30 глаз).

Максимальное падение ВГД при инстилляции эналаприлата в составе 5 кДа хитозановых частиц достигалось через 3 часа после инстилляции, а к 6 часам значения ВГД практически возвращались к исходным значениям (Рис. 38А). При сравнении с гибридными частицами оказалось, что до 4 часов после инстилляции данные по падению ВГД статистически неразличимы, однако через 5 часов при использовании эналаприлата в составе гибридных частиц ВГД оставалось более сниженным по сравнению с хитозановыми частицами (Рис. 48А). Казалось бы, из-за более высокого ζ -потенциала хитозановых частиц (+21 мВ против +7 мВ у гибридных) они должны были лучше удерживаться на поверхности глаза и, соответственно, сильнее и дольше снижать ВГД под действием включенного в них эналаприлата. Однако процент включения эналаприлата в 5 кДа хитозановые частицы был меньше в 3 раза, чем в гибридные, одновременно с этим препарат очень медленно высвобождался из хитозановых частиц (Рис. 46). По-видимому, более высокий процент включения (66% в гибридные и 25% в хитозановые частицы) и более быстрое высвобождение эналаприлата из гибридных частиц обеспечивали более эффективное снижение ВГД по сравнению с 5 кДа хитозановыми частицами.

В результате инстилляции эналаприлата в составе гликоль-хитозановых частиц происходило резкое падение ВГД через 1 час после инстилляции, затем ВГД несколько повышалось, но все равно оставалось пониженным в течение 6 часов после инстилляции (Рис. 38Б). 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. 48Б). 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, было связано с несколькими параметрами - близкими процентами включения препарата (41% в хитозановые и 72% в гибридные), не сильно различающимися значениями ζ -потенциала (+10 мВ и +17 мВ), а также высоким содержанием гликоль-хитозана в гибридных частицах (Табл. 24, 37, 38).

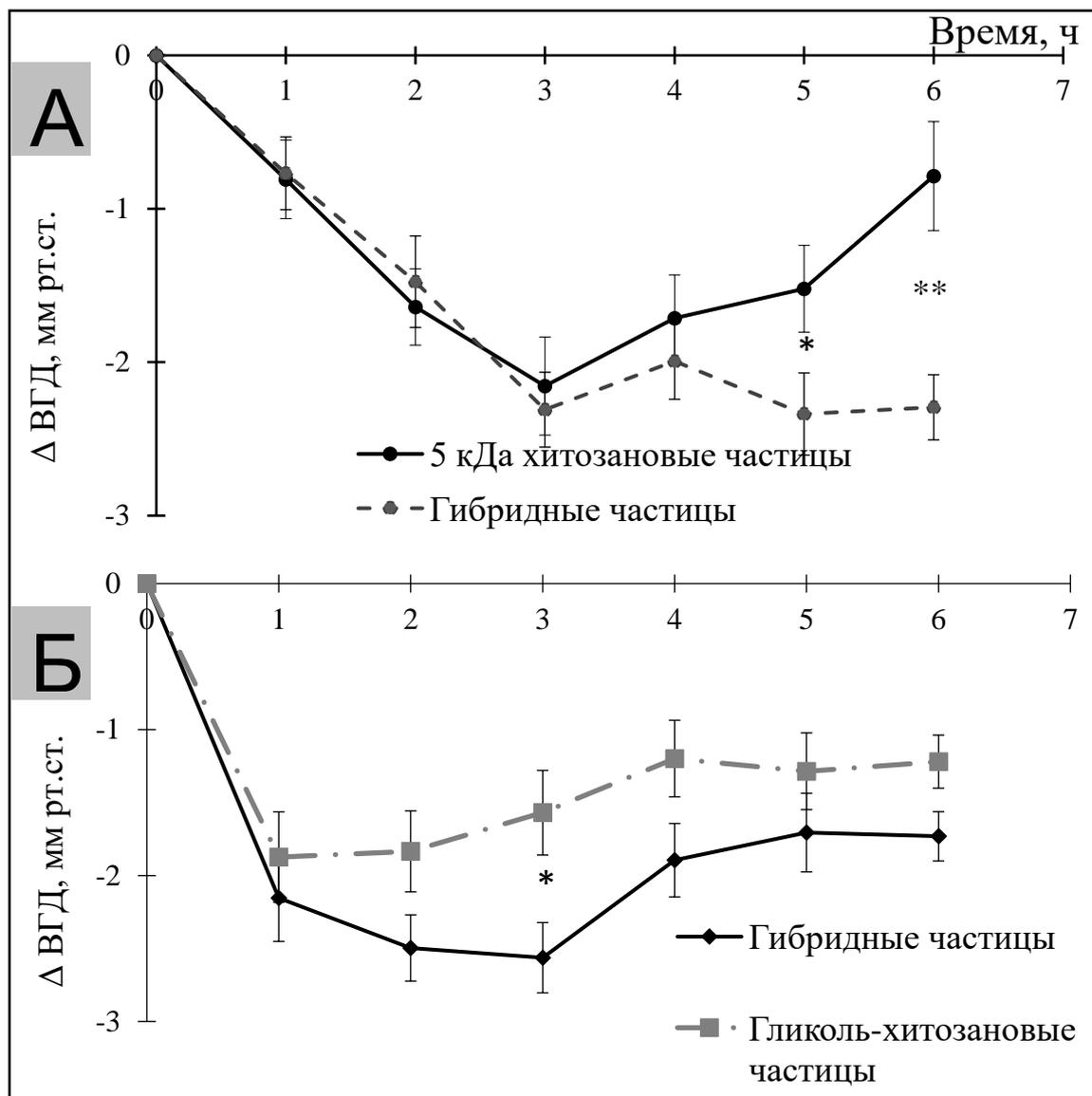


Рис. 38. Снижение ВГД у кроликов после однократной инстилляцией эналаприлата в составе А) СаР-частиц, покрытых 5 кДа хитозаном (гибридные частицы), и в составе 5 кДа хитозановых частиц; Б) СаР-частиц, покрытых 72 кДа гликоль-хитозаном (гибридные частицы), и в составе гликоль-хитозановых частиц * – $U_{эмп} \leq U_{0,05}$, ** – $U_{эмп} \leq U_{0,01}$ (различия между значениями падения ВГД достоверны).

Таким образом, в экспериментах *in vivo* изучены частицы на основе хитозана, и показано, что они могут являться подходящим носителем для доставки ингибитора АПФ эналаприлата в глазные ткани, пролонгируя его нахождение в слезной жидкости у кролика, а также обеспечивая длительное и эффективное снижение ВГД после однократной инстилляцией. Их сравнение с гибридными частицами показало, что эналаприлат в составе гибридных частиц оказывал несколько более выраженное и пролонгированное действие, чем эналаприлат в составе хитозановых частиц.

Заключение

В результате проделанной работы нам удалось получить гибридные частицы на основе фосфата кальция, покрытого хитозанами, 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.

4. Выводы

1. Оптимизированы методики синтеза CaP-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 CaP-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 CaP-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 CaP-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 литературы

1. World report on vision. Geneva: World Health Organization; 2019 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241516570>
2. Jumelle C., Gholizadeh S., Annabi N., Dana R. Advances and limitations of drug delivery systems formulated as eye drops // *Journal of Controlling Release*. – 2020. – Т. 321. – С.1–22.
3. Joseph T.M., Mahapatra D., Esmaeli A., Piszczyk L., Hasanin M., Kattali M., Haponiuk J., Thomas S. Nanoparticles: Taking a Unique Position in Medicine // *Nanomaterials* – 2023. – Т. 13, № 3. – С.574.
4. Lakhani P., Patil A., Majumdar S. Recent advances in topical nano drug-delivery systems for the anterior ocular segment // *Therapeutic Delivery*. – 2018. – Т. 9, № 2. – С.137–153.
5. Dorozhkin S. V. Nanometric calcium orthophosphates (CaPO₄): preparation, properties and biomedical applications // *Advanced Nano-Bio-Materials and Devices*. – 2019. – Т. 3, № 4. – С.422–513.
6. Viswanathan K., Rathish P., Gopinath V., Janice R., Raj G. In ovo delivery of Newcastle disease virus conjugated hybrid calcium phosphate nanoparticle and to study the cytokine profile induction // *Materials Science and Engineering C*. – 2014. – Т. 45. – С.564–572.
7. Чеснокова Н.Б., Галицкий В.А., Безнос О.В., Бейшенова Г.А., Кост О.А. Никольская И.И. Получение кальций-фосфатных частиц, содержащих супероксиддисмутазу, и их влияние на воспалительный процесс в глазу при экспериментальном увеите у кроликов. // *Российский Офтальмологический Журнал*. – 2015. – Т. 4. – С.31–36.
8. Шимановская Е.В., Безнос О.В., Клячко Н.Л., Кост О.А., Никольская И.И., Павленко Т.А., Чеснокова Н.Б. Кабанов А.В. Получение кальций-фосфатных наночастиц, содержащих тимолол, и оценка их влияния на внутриглазное давление в эксперименте // *Вестник офтальмологии*. – 2012 – Т. 128, № 3. – С.15–18.
9. Dubashynskaya N., Poshina D., Raik S., Urtti A., Skorik Yu. Polysaccharides in ocular drug delivery // *Pharmaceutics*. – 2020. – Т. 12, № 1. – С.1–30
10. Muxika A., Etxabide A., Uranga J., Guerrero P., de la Caba K. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications // *Int J Biol Macromol*. – 2017. – Т. 105. – С.1358–1368.
11. Shariatinia Z. Pharmaceutical applications of chitosan // *Adv Colloid Interface Sci*. – 2019. – Т. 263, № 6. – С.131–194.
12. Jafarnik K., Ładniak A., Blicharska E., Czarnek K., Ekiert H., Wiącek A., Szopa A. Chitosan-Based Nanoparticles as Effective Drug Delivery Systems—A review // *Molecules*. – 2023. – Т. 28, № 4. – С.1-17.
13. Yadav C.S., Kalariya M.N., Ramana V.K. Emerging role of antioxidants in the protection of uveitis complications // *Curr Med Chem*. – 2011. – Т. 18, № 6. – С.931–942.

14. Twa M.D. Intraocular Pressure and Glaucoma // *Optometry and Vision Science*. – 2018. – Т. 95, № 2. – С.83–85.
15. Thomas C.J., Mirza R.G., Gill M.K. Age-Related Macular Degeneration // *Med Clin North Am*. – 2021. – Т. 105, № 3. – С.473–491.
16. Zhang X., Li S., Tang Y., Guo Y., Gao S. Intractable Ocular Diseases and Treatment Progress // *AAPS PharmSciTech*. – 2020. – Т. 21, № 6. – С.1–14.
17. Mirabito Colafella K.M., Bovée D.M., Danser A.H.J. The renin-angiotensin-aldosterone system and its therapeutic targets // *Exp Eye Res*. – 2019. – Т. 186. – 107680.
18. Choudhary R., Kapoor M., Singh A., Bodakhe S. Therapeutic targets of renin-angiotensin system in ocular disorders // *J Curr Ophthalmol*. – 2017. – Т. 29, № 1. – С.7–16.
19. Holappa M., Vapaatalo H., Vaajanen A. Many Faces of Renin-angiotensin System - Focus on Eye // *Open Ophthalmol J*. – 2017. – Т. 11, № 1. – С.122–142.
20. Holappa M., Vapaatalo H., Vaajanen A. Local ocular renin-angiotensin-aldosterone system: any connection with intraocular pressure? A comprehensive review // *Ann Med*. – 2020. – Т. 52, № 5. – С.191–206.
21. Чеснокова Н.Б., Кост О.А., Никольская И.И., Безнос О.В., Давыдова Н.Г., Столярова Е.П., Биневский П.В., Павленко Т.А. Влияние местного применения ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента на внутриглазное давление, гидродинамику глаза и активность ангиотензин-превращающего фермента в слезе и водянистой влаге (экспериментальное исследование) // *Российский офтальмологический журнал*. – 2009. – Т. 2, № 1. – С.42–48.
22. Igić R. Four decades of ocular renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems (1977–2017) // *Exp Eye Res*. – 2018. – Т. 166. – С.74–83.
23. Grigoryev A.V., Beznos O.V., Binevski P.V., Pavlenko T.P., Struchkova S.V., Chesnokova N.B., Kost O.A. The Perspectives of the Topical Use of Inhibitors of ACE for the Treatment of Eye Disease Accompanied by Ischemia and Increased Intraocular Pressure. // *Angiotensin-Converting Enzyme Function and Role in Disease* / ed. Cardador-Martínez A., Jiménez-Martínez C. Nova Science Publishers, Inc. – 2020. – С.91–112.
24. Чеснокова Н.Б., Кост О.А., Никольская И.И., Безнос О.В., Биневский П.В., Макаров П.В., Столярова Е.П. Павленко Т.А. Экспериментальное обоснование местного применения ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента для лечения ишемии тканей глаза на модели постожоговой ишемии конъюнктивы // *Вестник офтальмологии*. – 2008. – Т. 4. – С.28–31.
25. Чеснокова Н.Б., Кост О.А., Никольская И.И., Безнос О.В., Биневский П.В., Столярова Е.П., Павленко Т.А. Экспериментальное обоснование применение ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента для снижения воспалительных процессов в глазу // *Вестник офтальмологии*. – 2008. – Т. 124, № 2. – С.16–19.

26. Sahin O., Ziaei A. The Role of Renin-Angiotensin System in Ocular Inflammation and Uveitis // *Renin-Angiotensin System - Past, Present and Future*/ ed. Tolekova A. IntechOpen, - 2017.
27. Nagai N., Oike Y., Izumi-Nagai K., Koto T., Satofuka S., Shinoda H., Noda K., Ozawa Y., Inoue M., Tsubota K., Ishida S. Suppression of choroidal neovascularization by inhibiting angiotensin-converting enzyme: Minimal role of bradykinin // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2007. – T. 48, № 5. – C.2321–2326.
28. Sjølie A.K., Dodson P., Hobbs F.R.R. Does renin-angiotensin system blockade have a role in preventing diabetic retinopathy? A clinical review // *Int J Clin Pract.* – 2011. – T. 65, № 2. – C.148–153.
29. Hirooka K., Shiraga F. Potential role for angiotensin-converting enzyme inhibitors in the treatment of glaucoma. // *Clin Ophthalmol.* – 2007. – T. 1, № 3. – C.217–223.
30. Bernstein K., Ong F., Blackwell W.-L., Shah K., Giani J., Gonzalez-Villalobos R., Shen X., Fuchs S., Touyz R. A Modern Understanding of the Traditional and Nontraditional Biological Functions of Angiotensin-Converting Enzyme // *Pharmacol Rev.* – 2013. – T. 65, № 1. – C.1–46.
31. Eleutherio E., Magalhães R., Brasil A., Neto J., Paranhos L. SOD1, more than just an antioxidant // *Arch Biochem Biophys.* – 2021. – T. 697. – 108701
32. Reina-Torres E., De Leso M., Pasquale L., Madekurozwa M., van Batenburg-Sherwood J., Overby D., Stamer W. The vital role for nitric oxide in intraocular pressure homeostasis // *Prog Retin Eye Res.* – 2021. – T. 83. – 100922.
33. Zhou X., Lv J., Gang L., Qian T., Jiang H., Xu J., Cheng Y., Hong J. Rescue the retina after the ischemic injury by polymer-mediated intracellular superoxide dismutase delivery // *Biomaterials.* – 2021. – T. 268. – 120600
34. Vaneev A.N., Kost O.A., Ereemeev N.L., Beznos O.V., Alova A.V., Gorelkin P.V., Erofeev A.S., Chesnokova N.B., Kabanov A.V., Klyachko N.B.. Superoxide Dismutase 1 Nanoparticles (Nano-SOD1) as a Potential Drug for the Treatment of Inflammatory Eye Diseases // *Biomedicines.* – 2021. – T. 9, № 4. – C.396.
35. Willoughby C.E., Ponzin D., Ferrari S., Lobo A., Landau K., Omidi Y. Anatomy and physiology of the human eye: effects of mucopolysaccharidoses disease on structure and function – a review // *Clin Exp Ophthalmol.* – 2010. – T. 38., № SUPPL. 1. – C.2–11.
36. Stahl U., Willcox M., Stapleton F. Osmolality and tear film dynamics // *Clinical and Experimental Optometry.* – 2012. – T. 95, № 1. – C. 3–11.
37. Rini Rachel Joseph, Subbu S Venkatraman. Drug delivery to the eye: what benefits do nanocarriers offer? // *Nanomedicine.* – 2017. – T. 12, № 6. – C.683–702.
38. Whittaker A.L., Williams D.L. Evaluation of lacrimation characteristics in clinically normal New Zealand white rabbits by using the Schirmer tear test i // *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science.* – 2015. – T. 54, № 6. – C.783–787.

39. Weinreb R.N., Aung T., Medeiros F.A. The Pathophysiology and Treatment of Glaucoma: A Review // *JAMA*. – 2014. – Т. 311, № 18. – С.1901–1911.
40. Gao X., Liu K., Hu C., Chen K., Jiang Z. Captopril alleviates oxidative damage in diabetic retinopathy // *Life Sci*. – 2022. – Т. 290. – 120246
41. Нероев В.В., Чеснокова Н.Б., Кост О.А., Охоцимская Т.Д., Павленко Т.А., Безнос О.В., Биневский П.В., Лисовская О.А. Брадикинин и ангиотензин-превращающий фермент в крови больных с диабетической ретинопатией и прогноз развития диабетического макулярного отека (пилотное исследование) // *Проблемы Эндокринологии*. – 2021. – Т. 67, № 4. – С.13–19.
42. Mazet R., Yameogo J., Wouessidjewe D., Choisnard L., Geze A. Recent advances in the design of topical ophthalmic delivery systems in the treatment of ocular surface inflammation and their biopharmaceutical evaluation // *Pharmaceutics*. – 2020. – Т. 12, № 6. – С.1–56.
43. Janagam D.R., Wu L., Lowe T.L. Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2017. – Т. 122. – С.31–64.
44. Reddy M.K., Wu L., Kou W., Ghorpade A., Labhesetwar V. Superoxide dismutase-loaded PLGA nanoparticles protect cultured human neurons under oxidative stress // *Appl Biochem Biotechnol*. – 2008. – Т. 151, № 2–3. – С.565–577.
45. Kumskova N., Ermolenko Y., Osipova N., Semyonkin A., Kildeeva N., Gorshkova M., Kovalskii A., Kovshova T., Tarasov V., Kreuter J., Maksimenko O., Gelperina S. How subtle differences in polymer molecular weight affect doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles degradation and drug release // *Journal of Microencapsulation*. – 2020. – Т. 37, № 3. – С.283–295.
46. Khan N., Ameduzzafar, Khanna K., Bhatnagar A., Ahmad F., Ali A. Chitosan coated PLGA nanoparticles amplify the ocular hypotensive effect of forskolin: Statistical design, characterization and in vivo studies // *Int J Biol Macromol*. – 2018. – Т. 116. – С.648–663
47. Pandit J., Sultana Y., Aqil M. Chitosan-coated PLGA nanoparticles of bevacizumab as novel drug delivery to target retina: optimization, characterization, and in vitro toxicity evaluation // *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. – 2017. – Т. 45, № 7. – С.1397–1407.
48. Chatzitaki A.-T., Jesus S., Karavasili C., Andreadis D., Fatouros D., Borges O. Chitosan-coated PLGA nanoparticles for the nasal delivery of ropinirole hydrochloride: in vitro and ex vivo evaluation of efficacy and safety // *Int J Pharm*. – 2020. – 119776.
49. Nagarwal R.C., Kumar R., Pandit J.K. Chitosan coated sodium alginate-chitosan nanoparticles loaded with 5-FU for ocular delivery: In vitro characterization and in vivo study in rabbit eye // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2012. – Т. 47, № 4. – С.678–685.
50. Shinde U.A., Shete J., Nair H., Singh K. Design and characterization of chitosan-alginate microspheres for ocular delivery of azelastine // *Pharm Dev Technol*. – 2014. – Т. 19, № 7. – С.813–823.

51. Navarro-Partida J., Castro-Castaneda C., Cruz-Pavlovicj F., Aceves-Franco L., Guy T., Santos A. Lipid-based nanocarriers as topical drug delivery systems for intraocular diseases // *Pharmaceutics*. – 2021. – Т. 13, № 5. – С.678 1-25.
52. Trofimov A.D. et al. Porous inorganic carriers based on silica, calcium carbonate and calcium phosphate for controlled/modulated drug delivery: Fresh outlook and future perspectives // *Pharmaceutics*. 2018. Vol. 10, № 4. 1.-35 p.
53. Шимановская Е.В., Никольская И.И., Биневский П.В., Безнос О.В., Клячко Н.Л., Павленко Т.А., Чеснокова Н.Б. Кост О.А. Лизиноприл в составе кальций-фосфатных наночастиц как перспективный антиглаукомный препарат // *Российские нанотехнологии*. – 2014. – Т. 9. – С.100–106.
54. Никольская И.И., Безнос О.В., Ельцов А.И., Гачок И.В., Чеснокова Н.Б., Варламов В.П., Кост О.А. Включение тимолола и лизиноприла в кальций-фосфатные частицы, покрытые хитозаном: применение в офтальмологии // *Вестник Московского Университета*. – 2018. – Т. 59, № 2. – С.170–176.
55. Никольская И.И., Безнос О.В., Галицкий В.А., Чеснокова Н.Б., Кост О.А. Кальций-фосфатные частицы, содержащие супероксиддисмутазу – перспективный препарат для лечения заболеваний глаз, сопровождающихся окислительным стрессом // *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия*. – 2016. –Т. 57, №3. – С. 138-144.
56. Binevski P.V., Balabushevich N.G., Uvarova V.I., Vikulina A.S., Volodkin D. Bio-friendly encapsulation of superoxide dismutase into vaterite CaCO₃ crystals. Enzyme activity, release mechanism, and perspectives for ophthalmology // *Colloids Surf B Biointerfaces*. – 2019. – Т. 181. – С.437–449.
57. Subrizi A., Del Amo E., Korzhikov-Vlakh V., Tennikova T., Ruponen M., Urtti A. Design principles of ocular drug delivery systems: importance of drug payload, release rate, and material properties // *Drug Discov Today*. 2019. – Т. 24, № 8. – С. 1446–1457.
58. Zamboulis A., Nanaki S., Michailidou G., Koumentakou I., Lazaridou M., Ainali N., Xanthopoulou E., Bikiaris D. Chitosan and its derivatives for ocular delivery formulations: Recent advances and developments // *Polymers*. – 2020. – Т. 12, № 7. – С. 1-67.
59. Popov A. Mucus-Penetrating Particles and the Role of Ocular Mucus as a Barrier to Micro- And Nanosuspensions // *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. – 2020. – Т. 36, № 6. – С. 366–375.
60. Almeida H., Amaral M., Lobao P., Silva A., Lobo J. Applications of Polymeric and Lipid Nanoparticles in Ophthalmic Pharmaceutical Formulations: Present and Future Considerations // *J Pharm Pharm Sci*. – 2014. – Т. 17, № 3. – С.278–293.
61. Mahaling B., Katti D.S. Physicochemical properties of core-shell type nanoparticles govern their spatiotemporal biodistribution in the eye // *Nanomedicine*. – 2016. – Т. 12, № 7. – 2149–2160.

62. Dorozhkin S. V. Functionalized calcium orthophosphates (CaPO₄) and their biomedical applications // *J Mater Chem B*. – 2019. – Т. 7, № 47. – С.7471–7489
63. Dorozhkin S. V. Calcium orthophosphates (CaPO₄): occurrence and properties // *Prog Biomater.* – 2016. – Т. 5, № 1. – С.9–70.
64. Dorozhkin S. V. Amorphous calcium (ortho)phosphates // *Acta Biomaterialia*. – 2010. – Т. 6, № 12. – С.4457–4475.
65. Jeong J., Kim J., Shim J., Hwang N., Heo C. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration // *Biomaterials Research*. – 2019. – Т. 23, № 1. – С.1–11.
66. Morçöl T., Weidner J., Mehta A., Bell S., Block T. Calcium Phosphate Particles as Pulmonary Delivery System for Interferon- α in Mice // *AAPS PharmSciTech*. – 2017. – Т. 19, №1 – С. 395-412.
67. Zhao J., Zhao J., Qian Y., Zhang X., Zhou F., Zhang H., Lu H., Chen J., Wang X., Yu W. Solution combustion synthesis of calcium phosphate particles for controlled release of bovine serum albumin // *Materials Science and Engineering C*. – 2015. – Т. 50. – С.194–200.
68. Kester M, Heakal Y., Fox T., Sharma A., Robertson G., Morgan T., Altinoglu E., Tabakovic A., Parette M., Rouse S., Ruiz-Velasko V., Adair J. Calcium phosphate nanocomposite particles for in vitro imaging and encapsulated chemotherapeutic drug delivery to cancer Cells // *Nano Lett.* – 2008. – Т. 8, № 12. – С.4116–4121.
69. Вересов А.Г., Путляев В.И., Третьяков Ю.Д. Химия Неорганических Биоматериалов На Основе Фосфатов Кальция // *Журнал Рос. Хим. Об-Ва Им. Д.И. Менделеева*. – 2004. – Т. 4. – С.52–64.
70. Chusuei C.C. Calcium phosphate phase identification using XPS and time-of-flight cluster SIMS // *Anal Chem. American Chemical Society* – 1999. – Т. 71, № 1. – С.149–153.
71. Мищенко Е.В., Каратенко Е.Ю., Королева М.Ю., Бабусенко Е.С. Влияние цитрата натрия на синтез Ag-замещенного гидроксипатита // *Успехи в химии и химической технологии*. – 2017. – Т. 31, № 13. – С.22–24.
72. Safi S., Karimzadeh F., Labbaf S. Mesoporous and hollow hydroxyapatite nanostructured particles as a drug delivery vehicle for the local release of ibuprofen // *Materials Science and Engineering C*. – 2018. – Т. 92. – С.712–719.
73. Banik M., Basu T. Calcium phosphate nanoparticles: A study of their synthesis, characterization and mode of interaction with salmon testis DNA // *Dalton Transactions*. – 2014. – Т. 43, № 8. – С.3244–3259.
74. Северин А.В., Березин Я.А., Орлова М.А., Трофимова Т.П., Лупатов А.Ю., Егоров А.В., Плешаков В.М. Сорбция висмута (III) и его хлоридных комплексов с 2-аминопиримидиновым катионом на гидроксипатите разной структуры // *Известия Академии Наук. Серия химическая*. – 2020. – Т. 69, № 4. – С.665–670.

75. Северин А.В., Орлова М.А., Шаламова Е.С., Егоров А.В., Сиротин М.А. Наногидроксиапатит и его текстуры как потенциальные носители перспективных короткоживущих изотопов свинца // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2019. – Т. 68, № 12. – С.2197–2204.
76. Ren X., Sun Z., Ma X., Wang Y., Cui X., Yi Z., Sun X., Guo B., Li X. Alginate-Mediated Mineralization for Ultrafine Hydroxyapatite Hybrid Nanoparticles // Langmuir. – 2018. – Т. 34, № 23. – С.6797–6805.
77. Li B., Guo B., Fan H., Zhang X. Preparation of nano-hydroxyapatite particles with different morphology and their response to highly malignant melanoma cells in vitro // Appl Surf Sci. – 2008. – Т. 255, № 2. – С.357–360.
78. Орлова М. А., Николаев А. Л., Трофимова Т. П., Орлов А. П., Северин А. В., Калмыков С. Н. Наночастицы на основе гидроксиапатита и порфирифуллерепа для диагностического и терапевтического применения парамагнитных ионов и радионуклидов // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2018. – Т. 7, № 6. – С.86–93.
79. Damm D., Rojas-Sánchez L., Theobald H., Sokolova V., Wyatt R. T., Überla K., Epple M., Temchura V. Calcium phosphate nanoparticle-based vaccines as a platform for improvement of HIV-1 env antibody responses by intrastructural help // Nanomaterials. – 2019. – Т. 9, № 10. – С.1–17.
80. Ruffini A., Sprio S., Preti L., Tampieri A. Synthesis of Nanostructured Hydroxyapatite via Controlled Hydrothermal Route // Biomaterial-supported Tissue Reconstruction or Regeneration / ed. Barbeck M., Jung O., Smeets R., Koržinskas T. IntechOpen, - 2019.
81. Uskoković V., Uskoković D.P. Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: Chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents // J Biomed Mater Res B Appl Biomater. – 2011. – Т. 96B, № 1. – С.152–191.
82. Liu C., Huang Y., Shen W., Cui J. Kinetics of hydroxyapatite precipitation at pH 10 to 11 // Biomaterials. – 2001. – Т. 22, № 4. – С.301–306.
83. Harding I.S., Rashid N., Hing K.A. Surface charge and the effect of excess calcium ions on the hydroxyapatite surface // Biomaterials. – 2005. – Т. 26, № 34. – С.6818–6826.
84. Ding G. J., Zhu Y. J., Qi C., Lu B. Q., Chen F., Wu J. Porous hollow microspheres of amorphous calcium phosphate: Soybean lecithin templated microwave-assisted hydrothermal synthesis and application in drug delivery // J Mater Chem B. – 2015. – Т. 3, № 9. – С.1823–1830.
85. Antonucci J.M., Liu D.W., Skrtic D. Amorphous Calcium Phosphate Based Composites: Effect of Surfactants and Poly(ethylene oxide) on Filler and Composite Properties // J Dispers Sci Technol. – 2007. – Т. 28, № 5. – С.819
86. Vecstaudza J., Gasik M., Locs J. Amorphous calcium phosphate materials: Formation, structure and thermal behaviour // J Eur Ceram Soc. – 2019. – Т. 39, № 4. – С.1642–1649.

87. Yan J., Yang H., Luo T. Hua F., He H. Application of Amorphous Calcium Phosphate Agents in the Prevention and Treatment of Enamel Demineralization // *Front Bioeng Biotechnol.* – 2022. – T. 10. – C.725.
88. Sun R. et al. Highly Porous Amorphous Calcium Phosphate for Drug Delivery and Bio-Medical Applications // *Nanomaterials.* – 2020. – T. 10, № 1. – C. 1-18.
89. Eliaz N., Metoki N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications // *Materials* – 2017. – T. 10, № 4. – C.334.
90. Pazourková L., Hundáková M., Peikertová P., Simha Martynková G. Preparation of calcium-deficient hydroxyapatite particles on vermiculite by precipitation and sonication // *Journal of the Australian Ceramic Society.* – 2017. – T. 53, № 2. – C.775–785.
91. Qi C., Zhu Y., Zhao X., Lu B., Tang Q., Zhao J. Highly Stable Amorphous Calcium Phosphate Porous Nanospheres: Microwave-Assisted Rapid Synthesis Using ATP as Phosphorus Source and Stabilizer, and Their Application in Anticancer Drug Delivery. // *Chemistry.* – 2013. – C.981–987.
92. Chen R., Qian Y., Li R., Zhang Q., Liu D., Wang M., Xu Q. Methazolamide Calcium Phosphate Nanoparticles in an Ocular Delivery System // *Yakugaku Zasshi.* – 2010. – T. 130, № 3. – C.419–424.
93. Jin S.D., Um S.C., Lee J.K. Surface Modification of Zirconia Substrate by Calcium Phosphate Particles Using Sol-Gel Method // *J Nanosci Nanotechnol.* – 2015. – T. 15, № 8. – C.5946–5950.
94. Beigoli S., Hekmat A., Farzanegan F., Darroudi M. Sol-gel synthesis of amorphous calcium phosphate nanoparticles in brown rice substrate and assessment of their cytotoxicity and antimicrobial activities // *Avicenna J Phytomed.* – 2022. – T. 12, № 1. – C.77–88.
95. Sharma R., Barth B., M., Altino E., Í., Morgan T., T., Sriram S., Kaiser J., M., McGovern C., Matters G., Smith J., Adair J. Bioconjugation of Calcium Phosphate Nanoparticles for Selective Targeting of Human Breast and Pancreatic Cancers In Vivo//*ACS Nano.* – 2011. – T. 4, № 3. – C.1279–1287.
96. Cao P., Han F., Y., Grøndahl L., Xu Z., P., Li L. Enhanced Oral Vaccine Efficacy of Polysaccharide-Coated Calcium Phosphate Nanoparticles // *ACS Omega.* – 2020. – T. 5, № 29. – C.18185–18197.
97. Sokolova V., Epple M. Biological and Medical Applications of Calcium Phosphate Nanoparticles // *Chemistry - A European Journal.* – 2021. – T. 27, № 27. – C.7471–7488.
98. Ebrahimi M., Botelho M., Lu W., Monmaturapoj N. Synthesis and characterization of biomimetic bioceramic nanoparticles with optimized physicochemical properties for bone tissue engineering // *J Biomed Mater Res A.* – 2019. – T. 107, № 8. – C.1654–1666.

99. Laonapakul T., Sutthi R., Chaikool P., Talangkun S., Boonma A., Chindaprasirt P. Calcium phosphate powders synthesized from CaCO₃ and CaO of natural origin using mechanical activation in different media combined with solid-state interaction // *Mater Sci Eng C*. – 2021. – Т. 118. – 111333
100. Северин А., В., Орлова М., А., Кушнир Е., А., Егоров А., В. Сорбционное и сокристаллизационное связывание ионов Zr(IV) с гидроксипатитом – перспективным носителем медицинского радионуклида ⁸⁹Zr // *Известия Академии наук. Серия химическая*. – 2022. – Т. 71, № 3. – С.449–456.
101. Hoffmann C., Zollfrank C., Ziegler G. Enzyme-catalysed synthesis of calcium phosphates // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2007. – Т. 19, № 2. – С.907–915.
102. Bell Steve., He Q., Chu T., Potter D. Intraocular delivery compositions and methods. 2002. US Patent 20030185892A1
103. Belle S., He Q. Biodegradable Calcium Phosphate Nanoparticles as a New Vehicle for Ocular Delivery of a Potential Ocular Hypotensive Agent. // *J Ocul Pharmacol Ther*. – 2002. – Т. 18, № 6. – С. 507-514
104. Chen J., Qiu M., Zhang S., Li B., Li D., Huang X., Qian Z., Zhao J., Wang Z., Tang D. A calcium phosphate drug carrier loading with 5-fluorouracil achieving a synergistic effect for pancreatic cancer therapy // *J Colloid Interface Sci*. – 2022. – Т. 605. – С.263–273.
105. Tang J., Li L., Howard C., B., Mahler S., M., Huang L., Xu Z. Preparation of optimized lipid-coated calcium phosphate nanoparticles for enhanced in vitro gene delivery to breast cancer cells // *J Mater Chem B*. – 2015. – Т. 3, № 33. – С.6805–6812.
106. Singh S., Bhardwaj P., Singh V., Aggarwal S., Mandal U. Synthesis of nanocrystalline calcium phosphate in microemulsion—effect of nature of surfactants // *J Colloid Interface Sci*. – 2008. – Т. 319, № 1. – С.322–329.
107. Jaroszewicz J., Idaszek J., Choinska E., Szlczak K., Hyc A., Osiecka-Iwan A., Swieszkowski W., Moskalewski S. Formation of calcium phosphate coatings within polycaprolactone scaffolds by simple, alkaline phosphatase-based method // *Materials Science and Engineering: C*. – 2019. – Т. 96. – С.319–328.
108. Hou X., Zhang L., Zhou Z., Luo X., Wang T., Zhao X., Zheng L. Calcium Phosphate-Based Biomaterials for Bone Repair // *J Funct Biomater*. – 2022. – Т. 13, № 4. – С.187.
109. Mok Z., H., Mylonas P., Austin R., Proctor G., Pitts N., Thanou M. Calcium phosphate nanoparticles for potential application as enamel remineralising agent tested on hydroxyapatite discs // *Nanoscale*. *Nanoscale*, – 2021. – Т. 13, № 47. – С.20002–20012.
110. Osmond M.J., Krebs M.D. Tunable chitosan-calcium phosphate composites as cell-instructive dental pulp capping agents // *J Biomater Sci Polym* – 2021. – Т. 32, № 11. – С.1450–1465.

111. Son K.D., Kim Y.-J. Anticancer activity of drug-loaded calcium phosphate nanocomposites against human osteosarcoma // *Biomater Res.* – 2017. – Т. 39, № 5. – С.25.
112. Zhou Q., Wang Y., Xiang J., Piao Y., Zhou Z., Tang J., Shen Y. Stabilized calcium phosphate hybrid nanocomposite using a benzoxaborole-containing polymer for pH-responsive siRNA delivery // *Biomater Sci. Royal Society of Chemistry*, – 2018. – Т. 6, № 12. – С.3178–3188.
113. He H., Zheng N., Song Z., Kim K., H., Yao C., Zhang R., Zhang C., Huang Y., Uckun F., Cheng J., Zhang Y., Yin L. Suppression of Hepatic Inflammation via Systemic siRNA Delivery by Membrane-Disruptive and Endosomolytic Helical Polypeptide Hybrid Nanoparticles // *ACS Nano*. – 2016. – Т. 10, № 2. – С.1859–1870.
114. Zhou Z., Liu X., Zhu D., Wang Y., Zhang Z., Zhou X., Shen Y. Nonviral cancer gene therapy: Delivery cascade and vector nanoproperty integration // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2017. – Т. 115. – С.115–154.
115. Guo L., Wang L., Yang R., Feng R., Li Z., Zhou X., Dong Z., Gharthey-Kwasah G., Xu M., Nishi M., Zhang Q., Isaacs W., Ma J., Xu X. Optimizing conditions for calcium phosphate mediated transient transfection // *Saudi J Biol Sci.* – 2017. – Т. 24, № 3. – С.622–629.
116. Olton D., Li J., Wilson M., E., Rogers T., Close J., Huang L., Kumta P., Sfeir C. Nanostructured calcium phosphates (NanoCaPs) for non-viral gene delivery: Influence of the synthesis parameters on transfection efficiency // *Biomaterials*. – 2007. – Т. 28, № 6. – С.1267–1279.
117. Sokolova V., Rojas-Sánchez L., Białas N., Schulze N., Epple M Calcium phosphate nanoparticle-mediated transfection in 2D and 3D mono- and co-culture cell models // *Acta Biomater.* – 2018. – Т. 15, №84. – С. 391-401.
118. Bisso S., Mura S., Castagner B., Couvreur P., Leroux J. Dual delivery of nucleic acids and PEGylated-bisphosphonates via calcium phosphate nanoparticles // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2019. – Т. 142. – С.142–152.
119. Abkar M., Alamian S., Sattarahmady N. A comparison between adjuvant and delivering functions of calcium phosphate, aluminum hydroxide and chitosan nanoparticles, using a model protein of *Brucella melitensis* Omp31 // *Immunol Lett.* – 2019. – Т. 207. – С.28–35.
120. Чеснокова Н.Б., Кост О.А., Никольская И.И., Безнос О.В., Давыдова Н.Г., Столярова Е.П., Биневский П.В. Павленко Т.А. Влияние местного применения ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента на внутриглазное давление, гидродинамику глаза и активность ангиотензин-превращающего фермента в слезе и водянистой влаге (экспериментальное исследование) // *Вестник офтальмологии*. – 2008. – Т. 124, № 4. – С.28–31.
121. Xu Z., Liu C., Wei J., Sun J. Effects of four types of hydroxyapatite nanoparticles with different nanocrystal morphologies and sizes on apoptosis in rat osteoblasts // *J Appl Toxicol.* – 2012. – Т. 32, № 6. – С.429–435.

122. Turkez H., Yousef M., I., Sönmez E., Togar B., Bakan F., Sozio P., Stefano A Evaluation of cytotoxic, oxidative stress and genotoxic responses of hydroxyapatite nanoparticles on human blood cells // *J Appl Toxicol.* – 2014. – Т. 34, № 4. – С.373–379.
123. Ooi C., Ling Y., Abdullah W., Mustafa A., Pung S., Yeoh F. Physicochemical evaluation and in vitro hemocompatibility study on nanoporous hydroxyapatite // *J Mater Sci Mater Med.* – 2019. – Т. 30, № 4. – С.1–10.
124. Epple M. Review of potential health risks associated with nanoscopic calcium phosphate // *Acta Biomaterialia.* – 2018. – Т. 77. – С.1–14.
125. Zhu M., Nie G., Meng H., Xia T., Nel A., Zhao Y. Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate // *Acc Chem Res.* – 2013. – Т. 46, № 3. – С.622–631.
126. Sokolova V., Kozlova D., Knuschke T., Buer J., Westendorf A., Epple M. Mechanism of the uptake of cationic and anionic calcium phosphate nanoparticles by cells // *Acta Biomater.* – 2013. – Т. 9, № 7. – С.7527–7535.
127. Kopp M., Rotan O., Papadopoulos C., Schulze N., Meyer H., Epple M. Delivery of the autofluorescent protein R-phycoerythrin by calcium phosphate nanoparticles into four different eukaryotic cell lines (HeLa, HEK293T, MG-63, MC3T3): Highly efficient, but leading to endolysosomal proteolysis in HeLa and MC3T3 cells // *PLoS One.* – 2017. – Т. 12, № 6.
128. Neumann S., Kovtun A., Dietzel I., D., Epple M., Heumann R. The use of size-defined DNA-functionalized calcium phosphate nanoparticles to minimise intracellular calcium disturbance during transfection // *Biomaterials.* – 2009. – Т. 30, № 35. – С.6794–6802.
129. Boegh M., Nielsen H.M. Mucus as a barrier to drug delivery - Understanding and mimicking the barrier properties // *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology.* – 2015. – Т. 116, № 3. – С.179–186.
130. Ways T.M.M., Lau W.M., Khutoryanskiy V. V. Chitosan and its derivatives for application in mucoadhesive drug delivery systems // *Polymers.* – 2018. – Т. 10, № 3.
131. «ХИТОЗАН» / под. Ред. Скрыбина К.Г., Михайлова С.Н., Варламова В.П. ЦЕНТР «БИОИНЖЕНЕРИЯ» РАН, 2013, 593 с..
132. Naskar S., Sharma S., Kuotsu K. Chitosan-based nanoparticles: An overview of biomedical applications and its preparation // *J Drug Deliv Sci Technol.* – 2019. – Т. 49, № October – 2018. – С.66–81.
133. Sogias I.A., Williams A.C., Khutoryanskiy V. V. Why is Chitosan Mucoadhesive? // *Biomacromolecules.* – 2008. – Т. 9, № 7. – С.1837–1842.
134. Sogias I.A., Khutoryanskiy V. v., Williams A.C. Exploring the Factors Affecting the Solubility of Chitosan in Water // *Macromol Chem Phys.* – 2010. – Т. 211, № 4. – С.426–433.

135. Chang S., Lin H., Wu G., Tsai G. pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan // *Carbohydr Polym.* – 2015. – Т. 134. – С.74–81.
136. Szymańska E., Winnicka K. Stability of chitosan-a challenge for pharmaceutical and biomedical applications. // *Mar Drugs.* – 2015. – Т. 13, № 4. – С.1819–1846.
137. Onishi H., Machida Y. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice // *Biomaterials.* – 1999. – Т. 20, № 2. – С.175–182.
138. Li H., Jiang Z., Han B., Niu S., Dong W., Liu W. Pharmacokinetics and biodegradation of chitosan in rats // *Journal of Ocean University of China.* – 2015. – Т. 14, № 5. – С.897–904.
139. Zubareva A., Shagdarova B., Varlamov V., Kashirina E., Svirshchevskaya E. Penetration and toxicity of chitosan and its derivatives // *Eur Polym J.* – 2017. – Т. 93. – С.743–749.
140. Xing L., Fan Y., Zhou T., Gong J., Cui L., Cho K., Cho C. Chemical modification of Chitosan for efficient vaccine delivery // *Molecules.* – 2018. – Т. 23. – № 2.
141. Варламов В.П., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Луньков А.П., Мысякина И.С. Хитин/хитозан и его производные: фундаментальные и прикладные аспекты // *Успехи биологической химии.* – 2020. – Т. 20. – С.317–368.
142. Lopez-Moya F., Suarez-Fernandez M., Lopez-Llorca L.V. Molecular mechanisms of chitosan interactions with fungi and plants // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2019. – Т. 20, № 2. – 332.
143. Galván Márquez I., Akuaku J., Cruz I., Cheetham J., Golshani A., Smith M. Disruption of protein synthesis as antifungal mode of action by chitosan // *Int J Food Microbiol.* – 2013. – Т. 164, № 1. – С.108–112.
144. Tauffenberger A., Magistretti P.J. Reactive Oxygen Species: Beyond Their Reactive Behavior // *Neurochemical Research* 2021 46:1. Springer, – 2021. – Т. 46, № 1. – С.77–87.
145. Abd El-Hack M., El-Saadony M., Shafi M., Zabermaawi N., Arif M., Batiha G., Al-Sagheer A. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review // *Int J Biol Macromol.* – 2020. – Т. 164. – С.2726–2744.
146. Anraku M., Fujii T., Furutani N., Kadowaki D., Maruyama T., Otagiri M., Tomida H. Antioxidant effects of a dietary supplement: reduction of indices of oxidative stress in normal subjects by water-soluble chitosan // *Food Chem Toxicol.* – 2009. – Т. 47, № 1. – С.104–109.
147. Sun T., Zhou D., Mao F., Zhu Y. Preparation of low-molecular-weight carboxymethyl chitosan and their superoxide anion scavenging activity // *Eur Polym J.* – 2007. – Т. 43, № 2. – С.652–656.
148. Chang S.H., Wu C.H., Tsai G.J. Effects of chitosan molecular weight on its antioxidant and antimutagenic properties // *Carbohydr Polym.* – 2018. – Т. 181. – С.1026–1032.

149. Silva M., Calado R., Marto J., Bettencourt A., Almeida A., Gonçalves L. Chitosan nanoparticles as a mucoadhesive drug delivery system for ocular administration // *Mar Drugs*. – 2017. – T. 15, № 12. – 370.
150. Almeida H., Lobão P., Frigerio C., Fonseca J., Silva R., Sousa Lobo J., Amaral M. Preparation, characterization and biocompatibility studies of thermoresponsive eyedrops based on the combination of nanostructured lipid carriers (NLC) and the polymer Pluronic F-127 for controlled delivery of ibuprofen // *Pharm Dev Technol*. – 2017. – T. 22, № 3. – C.336–349.
151. Lee S., Koo J., Yang M., Cho H.-J. Application of temporary agglomeration of chitosan-coated nanoparticles for the treatment of lung metastasis of melanoma // *J Colloid Interface Sci*. – 2019. – T. 544. – C.266–275.
152. Abd El Hady W., Mohamed E., Soliman O., el Sabbagh H. In vitro–in vivo evaluation of chitosan-PLGA nanoparticles for potentiated gastric retention and anti-ulcer activity of diosmin // *Int J Nanomedicine*. – 2019. – T. 14. – C.7191–7213.
153. Yu A., Shi H., Liu H., Bao Z., Dai M., Lin D., Wang Y. Mucoadhesive dexamethasone-glycol chitosan nanoparticles for ophthalmic drug delivery // *Int J Pharm*. – 2020. – T. 575, № 15. – C. 118943
154. Song Y., Nagai N., Saijo S., Kaji H., Nishizawa M., Abe T. In situ formation of injectable chitosan-gelatin hydrogels through double crosslinking for sustained intraocular drug delivery // *Materials Science and Engineering C*. – 2018. – T. 88, № February. – C.1–12.
155. Shamekhi F., Tamjid E., Khajeh K. Development of chitosan coated calcium-alginate nanocapsules for oral delivery of liraglutide to diabetic patients // *Int J Biol Macromol*. – 2018. – T. 120. – C.460–467.
156. Ye B., Zheng R., Ruan X., Zheng Z., Cai H. Chitosan-coated doxorubicin nano-particles drug delivery system inhibits cell growth of liver cancer via p53/PRC1 pathway // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2018. – T. 495. – № 1. – C.414–420.
157. Yang C.-L., Chen J.-P., Wei K.-C., Chen J.-Y., Huang C.-W., Liao Z.-X. Release of Doxorubicin by a Folate-Grafted, Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticle // *Nanomaterials*. – 2017. – T. 7, № 4. – 85.
158. Palanisamy U., Kandasamy R., Kamaraj S., Kadhar M., Maria G., Gangasalam A. Curcumin drug delivery by vanillin-chitosan coated with calcium ferrite hybrid nanoparticles as carrier // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2018. – T. 116. – C.48–60.
159. Bai K., Hong B., Hong Z., Sun J., Wang C. Selenium nanoparticles-loaded chitosan/citrate complex and its protection against oxidative stress in d-galactose-induced aging mice // *J Nanobiotechnology*. – 2017. – T. 15, № 1. – C.92.
160. Gierszewska-Drużyńska M., Ostrowska-Czubenko J., Kwiatkowska A. Effect of ionic crosslinking on density of hydrogel chitosan membranes // *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*. – 2013. – T. 18. – C.49–58.

161. Gaspar V., Sousa F., Queiroz J., Correia I. Formulation of chitosan-TPP-pDNA nanocapsules for gene therapy Applications // *Nanotechnology*. – 2011. – T. 22, № 1. – 015101.
162. Mikhailov S. N., Zakharova A. N., Drenichev M. S., Ershov A. V., Kasatkina M. A., Vladimirov L. V., Novikov V.V., Kildeeva N.R. Crosslinking of Chitosan with Dialdehyde Derivatives of Nucleosides and Nucleotides. Mechanism and Comparison with Glutaraldehyde // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, – 2016. – T. 35, № 3. – C.114–129.
163. Sabarudin A., Madjid A.D.R. Preparation and Kinetic Studies of Cross-Linked Chitosan Beads Using Dual Crosslinkers of Tripolyphosphate and Epichlorohydrin for Adsorption of Methyl Orange // *Scientific World Journal*. – 2021.
164. Chirio D., Peira E., Sapino S., Dianzani C., Barge A., Muntoni E., Gallarate M. Stearoyl-Chitosan Coated Nanoparticles Obtained by Microemulsion Cold Dilution Technique // *Int J Mol Sci*. – 2018. – T. 19, № 12. – C. 3833
165. Li J., Jin X., Yang Y., Zhang L., Liu R., Li Z. Trimethyl chitosan nanoparticles for ocular baicalein delivery: Preparation, optimization, in vitro evaluation, in vivo pharmacokinetic study and molecular dynamics simulation // *Int J Biol Macromol*. – 2020. – T. 156. – C.749–761.
166. Asasutjarit R., Theerachayanan T., Kewsuwan P., Veeranodha S., Fuongfuchat A., Ritthidej G., C. Development and Evaluation of Diclofenac Sodium Loaded-N-Trimethyl Chitosan Nanoparticles for Ophthalmic Use // *AAPS PharmSciTech*. – 2015. – T. 16, № 5. – C.1013–1024.
167. Silva N., Silva S., Sarmiento B., Pintado M. Chitosan nanoparticles for daptomycin delivery in ocular treatment of bacterial endophthalmitis // *Drug Deliv*. – 2015. – T. 22, № 7. – C.885–893.
168. da Silva S., Ferreira D., Pintado M., Sarmiento B. Chitosan-based nanoparticles for rosmarinic acid ocular delivery-In vitro tests // *Int J Biol Macromol*. – 2016. – T. 84. – C.112–120.
169. Natesan S., Pandian S., Ponnusamy C., Palanichamy R., Muthusamy S., Kandasamy R. Co-encapsulated resveratrol and quercetin in chitosan and peg modified chitosan nanoparticles: For efficient intra ocular pressure reduction // *Int J Biol Macromol*. – 2017. – T. 104. – C.1837–1845.
170. Rathore P., Mahor A., Jain S., Haque A., Kesharwani P. Formulation development, in vitro and in vivo evaluation of chitosan engineered nanoparticles for ocular delivery of insulin // *RSC Adv*. – 2020. – T. 10, № 71. – C.43629–43639.
171. Agarwal P., Raghu T., Singh R., Mohamed H., B., Ali M., Shafie A., Mekkawy A. Chitosan Nanoparticles for Meloxicam Ocular Delivery: Development, In Vitro Characterization, and In Vivo Evaluation in a Rabbit Eye Model // *Pharmaceutics* – 2022. – T. 14, № 5. –893.
172. Wang F., Zhang M., Zhang D., Huang Y., Chen L. Preparation, optimization, and characterization of chitosan-coated solid lipid nanoparticles for ocular drug delivery. // *J Biomed Res*. – 2018. – T. 32, № 6. – C.411–423

173. Radwan S., El-Moslemany R., Mehanna R., Thabet E., Abdelfattah E., El-Kamel A. Chitosan-coated bovine serum albumin nanoparticles for topical tetrandrine delivery in glaucoma: in vitro and in vivo assessment // *Drug Deliv.* – 2022. – T. 29, № 1. – C.1150–1163.
174. Luo Q., Zhao J., Zhang X., Pan W. Nanostructured lipid carrier (NLC) coated with Chitosan Oligosaccharides and its potential use in ocular drug delivery system // *Int J Pharm.* – 2011. – T. 403, № 1. – C.185–191.
175. Alqahtani F., Aleanizy F., Tahir E., el Alquadeib B., Alsarra I., Alanazi J., Abdelhady H. Preparation, characterization, and antibacterial activity of diclofenac-loaded chitosan nanoparticles // *Saudi Pharmaceutical Journal.* – 2019. – T. 27, № 1. – C.82–87.
176. Dubashynskaya N. V., Golovkin A. S., Kudryavtsev I.V., Prikhodko S.S., Trulioff A.S., Bokatyi A.N., Poshina D.N., Skorik Y.A Mucoadhesive cholesterol-chitosan self-assembled particles for topical ocular delivery of dexamethasone // *Int J Biol Macromol.* – 2020. – T. 158. – C.811–818.
177. González N., N., Cerri G., Molpeceres J., Cossu M., Rassu G., Giunchedi P., Gavini E. Surfactant-Free Chitosan/Cellulose Acetate Phthalate Nanoparticles: An Attempt to Solve the Needs of Captopril Administration in Paediatrics // *Pharmaceuticals.* – 2022. – T. 15, № 6. – C.662.
178. Radwan N., Nasr M., Ishak R., Abdeltawab N., Awad G. Chitosan-calcium phosphate composite scaffolds for control of post-operative osteomyelitis: Fabrication, characterization, and in vitro–in vivo evaluation // *Carbohydr Polym.* – 2020. – T. 244.
179. Gan D., Liu M., Xu T., Wang K., Tan H., Lu X. Chitosan/biphasic calcium phosphate scaffolds functionalized with BMP-2-encapsulated nanoparticles and RGD for bone regeneration // *J Biomed Mater Res A.* – 2018. – T. 106, № 10. – C.2613–2624.
180. Palaniraj S., Murugesan R., Narayan S. Chlorogenic acid- loaded calcium phosphate chitosan nanogel as biofilm degradative materials // *International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* – 2019. – T. 114, № April. – 105566.
181. Choi B., Cui Z., K., Kim S., Fan J., Wu B., M., Lee M. Glutamine-chitosan modified calcium phosphate nanoparticles for efficient siRNA delivery and osteogenic differentiation // *J Mater Chem B.* – 2015. – T. 3, № 31. – C.6448–6455.
182. Luo C., Wu S., Li J., Li X., Yang P., Li G. Chitosan/calcium phosphate flower-like microparticles as carriers for drug delivery platform // *Int J Biol Macromol.* – 2020. – T. 155. – C.174–183.
183. Salama A. Recent progress in preparation and applications of chitosan/calcium phosphate composite materials // *Int J of Biol Macromol.* – 2021. – T. 178. – C.240–252.
184. Rabiee N., Bagherzadeh M., Ghadiri A., Kiani M., Ahmadi S., Jajarmi V., Mostafavi E. Calcium-based nanomaterials and their interrelation with chitosan: optimization for pCRISPR delivery // *Journal of Nanostructure in Chemistry.* – 2021. – T. 12, № 5. – C.919–932.

185. Dumont V., Mansur H., Mansur A., Carvalho S., Capanema N., Barrioni B. Glycol chitosan/nanohydroxyapatite biocomposites for potential bone tissue engineering and regenerative medicine // *Int J Biol Macromol.* – 2016. – Т. 93. – С.1465–1478.
186. Drozdova M. G., Demina T. S., Dregval O. A., Gaidar A. I., Andreeva E. R., Zelenetskii A. N. Akopova T.A., Markvicheva E. Macroporous Hyaluronic Acid/Chitosan Polyelectrolyte Complex-Based Hydrogels Loaded with Hydroxyapatite Nanoparticles: Preparation, Characterization and In Vitro Evaluation // *Polysaccharides* – 2022. – Т. 3, № 4. –С. 745–760.
187. Маликова Т.В., Голованова О.А., Чиканова Е.С. Изучение физико-химических свойств композитов и каркасов на основе фосфатов кальция и хитозана // *Неорганические материалы.* – 2018. – Т. 54, № 9. – С.1011–1019
188. Pramanik N., Mishra D., Banerjee I., Maiti T., K., Bhargava P., Pramanik P. Chemical Synthesis, Characterization, and Biocompatibility Study of Hydroxyapatite/Chitosan Phosphate Nanocomposite for Bone Tissue Engineering Applications // *Int J Biomater.* – 2009. – Т. 2009. – С.1–8.
189. Wirth J., Tahriri M., Khoshroo K., Rasoulianboroujeni M., Dentino A., Tayebi L. Surface modification of dental implants // *Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering.* – 2017. – С.85–96.
190. Rahman M., Islam M., Haque P., Khan M., Takafuji M., Begum M., Rahman M. Calcium ion mediated rapid wound healing by nano-ZnO doped calcium phosphate-chitosan-alginate biocomposites // *Materialia.* – 2020. – Т. 13. – 100839.
191. Pang K., Cherry W., Terrell J., Ulm E. Disposition of enalapril and its diacid metabolite, enalaprilat, in a perfused rat liver preparation. Presence of a diffusional barrier for enalaprilat into hepatocytes. // *Drug Metab Dispos.* – Т. 12, № 3. – С.309–313.
192. Skrzypecki J., Grabska-Liberek I., Przybek J., Ufnal M. A common humoral background of intraocular and arterial blood pressure dysregulation // *Curr Med Res Opin.* – 2018. – Т. 34, № 3. – С.521–529.
193. White A., Cheruvu S., Sarris M., Liyanage S., Lumbers E., Chui J., McCluskey P. Expression of classical components of the renin-angiotensin system in the human eye // *JRAAS* – 2015. – Т. 16, № 1. – С.59–66.
194. Hirooka K., Kiuchi Y. The Retinal Renin-Angiotensin-Aldosterone System: Implications for Glaucoma // *Antioxidants* – 2022. – Т. 11, № 4. – С.610.
195. Sève P., Cacoub P., Bodaghi B., Trad S., Sellam J., Bellocq D. Kodjikian L. Uveitis: Diagnostic work-up. A literature review and recommendations from an expert committee // *Autoimmun Rev.* – 2017. – Т. 16, № 12. – С.1254–1264
196. Чеснокова Н.Б., Никольская И.И., Мухаметова Л.И., Кост О.А., Айсина Р.Б., Безнос О.В., Столярова Е.П., Гулин Д.А. Биневский П.В. Компоненты фибринолитической и ренин-ангиотензиновой систем в тканевых структурах и жидких средах глаза кроликов в норме и

- после ожога роговицы // Российский офтальмологический журнал. – 2008. – Т. 1, № 2. – С.46–50.
197. Vaajanen A. et al. Does the renin-angiotensin system also regulate intra-ocular pressure? // *Annals of Medicine*. – 2008. – Т. 40, № 6. – С.418–427.
198. Li Y., Yan Z., Chaudhry K., Kazlauskas A. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) Is One of the Effectors by Which Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)/Anti-VEGF Controls the Endothelial Cell Barrier // *American Journal of Pathology*. – 2020. – Т. 190, № 9. – С.1971–1981.
199. Чеснокова Н., Б., Кост О., А., Безнос О., В., Григорьев А., В., Биневский П., В., Павленко Т., А. Экспериментальное обоснование местного применения ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента в виде глазных капель при ишемических процессах в глазу // *Российский Офтальмологический Журнал*. – 2022. – Т. 15, № 3. – С.118–122.
200. Abbasi Pour S., Shaterian H.R. Design and characterization of lisinopril-loaded superparamagnetic nanoparticles as a new contrast agent for in vitro, in vivo MRI imaging, diagnose the tumors and drug delivery system // *J Mater Sci Mater Med*. – 2017. – Т. 28, № 6.
201. Li M., Li Y., Huang X., Lu X. Captopril-polyethyleneimine conjugate modified gold nanoparticles for co-delivery of drug and gene in anti-angiogenesis breast cancer therapy // *J Biomater Sci Polym* – 2015. – Т. 26, № 13. – С.813–827.
202. Dorniani D., Hussein M., Bin Kura A., Fakurazi S., Shaari A.б Ahmad Z. Sustained Release of Prindopril Erbumine from Its Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications // *Int J Mol Sci*. – 2013. – Т. 14, № 12. – С.23639–23653.
203. Ahlin P., Kristl J., Kristl A., Vrečer F. Investigation of polymeric nanoparticles as carriers of enalaprilat for oral administration // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2002. – Т. 239. – С.113–120.
204. Varshosaz J., Soheili M. Production and in vitro characterization of lisinopril-loaded nanoparticles for the treatment of restenosis in stented coronary arteries // *J Microencapsul*. – 2008. – Т. 25, № 7. – С.478–486.
205. de Azevedo M., Tasic L., Fattori J., Rodrigues F., Cantos F., Ribeiro L., Santos R. New formulation of an old drug in hypertension treatment: the sustained release of captopril from cyclodextrin nanoparticles. // *Int J Nanomedicine*. – 2011. – Т. 6. – С.1005–1016.
206. Ekambaram P., Abdul Hasan Sathali A. Formulation and evaluation of solid lipid nanoparticles of ramipril // *Journal of Young Pharmacists*. – 2011. – Т. 3, № 3. – С.216–220.
207. Remko M. Acidity, lipophilicity, solubility, absorption, and polar surface area of some ACE inhibitors // *Chemical Papers*. – 2007. – Т. 61, № 2.
208. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress // *Biochem Soc Trans*. – 2007. – Т. 35. – С.1147–1150.

209. Yasui K., Baba A. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation // *Inflammation Research*. – 2006. – Т. 55. – С.359–363.
210. Drozdova Y.I., Sidel V.O., Chebotarev V.Y. Effect of Erysod (Erythrocyte Superoxide Dismutase) on Blood Concentration of Reactive Oxygen Species in Patients with Severe Burns and Burn Shock. // *Bull Exp Biol Med*. – 2002. – Т. 5. – С.454–456.
211. Vorauer-Uhl K., Furnschliel E., Wagner A., Ferko B., Katinger H. Topically applied liposome encapsulated superoxide dismutase reduces postburn wound size and edema formation // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2001. – Т. 14. – С.63–67.
212. Reddy M.K., Wu L., Kou W. Superoxide Dismutase-Loaded PLGA Nanoparticles Protect Cultured Human Neurons Under Oxidative Stress // *Appl Biochem Biotechnol*. – 2008. – Т. 151. – С.565–577.
213. Manickam D. S., Brynskikh A. M., Kopanic J. L., Sorgen P. L., Klyachko N.L., Batrakova E.V., Bronich T.K., Kabanov A. V. Well-defined cross-linked antioxidant nanozymes for treatment of ischemic brain injury // *Journal of Controlled Release*. – 2012. – Т. 162, № 3. – С.636–645.
214. Giovagnoli S., Luca G., Casaburi I., Blasi P., Macchiarulo G., Ricci M., Rossi C. Long-term delivery of superoxide dismutase and catalase entrapped in poly (lactide-co-glycolide) microspheres: In vitro effects on isolated neonatal porcine pancreatic cell clusters // *Journal of Controlled Release*. – 2005. – Т. 107. – С.65–77.
215. Kost O. A., Beznos O.V., Davydova N.G., Manickam D.S., Nikolskaya I.I., Guller A. E., Binevski P.V., Chesnokoba N.B., Shekhter A.B., Klyachko N.L., Kabanov A.V. Superoxide Dismutase 1 Nanozyme for Treatment of Eye Inflammation // *Oxid Med Cell Longev*. – 2016. – Т. 2016. – С.1–13.
216. Алексеев В.Н., Мартынова Е.Б., Чурилова И.В. Патент РФ: 2144343С1. 1997.
217. Алексеев В.Н., Корелина В.Е., Шаша Ч. Нейропротекция новым антиоксидантом Рексод при экспериментальной глаукоме // *Клиническая офтальмология*. – 2008. - № 3. – С.82–83.
218. Чеснокова Н.Б., Нероев В.В., Безнос О.В., Бейшенова Г.А., Панова И.Г., Татиколов А.С. Влияние инстилляций дексаметазона и супероксиддисмутазы на течение увеита и локальные биохимические процессы (экспериментальное исследование) // *Вестник Офтальмологии*. – 2015. – Т. 131, № 3. – С.71–75.
219. Yuki K., Ozawa Y., Yoshida T., Kurihara T., Hirasawa M., Ozeki N., Tsubota K. Retinal Ganglion Cell Loss in Superoxide Dismutase 1 Deficiency // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2011. – Т. 52. – С.4143–4150.
220. Boerman O., Oyen W., Jorge C., Cruz M., Crommelin D. Subcutaneous Administration of Superoxide Dismutase Entrapped in Long Circulating Liposomes: In Vivo Fate and Therapeutic Activity in an Inflammation Model // *Pharm Res*. – 2000. – Т. 17, № 5. – С.600–606.

221. Cruz E., Gaspar M., Martins B., Corvo L. Liposomal Superoxide Dismutases and Their Use in the Treatment of Experimental Arthritis // *Methods Enzymol.* – 2005. – Т. 391. – С.395–413.
222. Çelik Ö., Akbuğa J. Preparation of superoxide dismutase loaded chitosan microspheres: Characterization and release studies // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* – 2007. – Т. 66, № 1. – С.42–47.
223. Gil D., Rodriguez J., Ward B., Vertegel A., Ivanov V., Reukov V. Antioxidant Activity of SOD and Catalase Conjugated with Nanocrystalline Ceria // *Bioengineering.* – 2017. – Т. 4. – № 1. – С. 1-18.
224. Costa C., Liu Z., Simões S., Correia A., Rahikkala A., Seitsonen J., Corvo M. One-step microfluidics production of enzyme-loaded liposomes for the treatment of inflammatory diseases // *Colloids Surf B Biointerfaces.* – 2021. – Т. 199. – 111556
225. Kost O.A., Bovin N., V., Chemodanova E., E., Nasonov V., V., Orth T., A. New feature of angiotensin-converting enzyme: carbohydrate-recognizing domain // *J. Mol. Recognit.* – 2000. – Т. 13. – С.360–369.
226. Hooper N., Keen J., Pappin D., Turner A. Pig kidney angiotensin converting enzyme // *J Biochem.* 1987. – Т. 247. – С.85–93.
227. Kanwar J.R., Mahidhara G., Kanwar R.K. Novel alginate-enclosed chitosan-calcium phosphate-loaded iron-saturated bovine lactoferrin nanocarriers for oral delivery in colon cancer therapy // *Nanomedicine.* – 2012. – Т. 7, № 10. – С.1521–1550.
228. Larionova N., I., Zubaerova D., K., Guranda D., T., Pechyonkin M., A., Balabushevich N., G. Colorimetric assay of chitosan in presence of proteins and polyelectrolytes by using o-phthalaldehyde // *Carbohydr Polym.* – 2009. – Т. 75, № 4. – С.724–727.
229. Palchoudhury S., Baalousha M., Lead J.R. Methods for Measuring Concentration (Mass, Surface Area and Number) of Nanomaterials // *Frontiers of Nanoscience.* – 2015. – Т. 8. – С.153–181.
230. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. // *Вопросы медицинской химии.* – 1990. – Т. 36. - №2. – С. 88-91.
231. Dash S., Murthy P., Narasimha N., Chowdhury P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems // *Acta Polinae Pharmaceutica - Drug Research.* – 2010. – Т. 67, № 3. – С.217–223.
232. Чеснокова Н.Б., Григорьев А.В., Мустафаева К.Н., Безнос О.В. Новая модель транзиторной ишемии глаза кроликов и количественная оценка степени ишемии методом офтальмоплетизмографии // *Российский Офтальмологический Журнал.* – 2018. – Т. 11, № 2. – С.35–40.

233. Kim M.H., Park H., Park W.H. Effect of pH and precursor salts on in situ formation of calcium phosphate nanoparticles in methylcellulose hydrogel // *Carbohydr Polym.* – 2018. – Т. 191. – С.176–182.
234. Peynshaert K., Devoldere J., de Smedt S., Remaut K. In vitro and ex vivo models to study drug delivery barriers in the posterior segment of the eye // *Advanced Drug Delivery Reviews.* – 2018. – Т. 126. – С.44–57.
235. Bigi A., Ghajeri F., Leifer K., Larsson A., Engqvist H., Xia W. The Influence of Residuals Combining Temperature and Reaction Time on Calcium Phosphate Transformation in a Precipitation Process // *Journal of Functional Biomaterials* – 2022. – Т. 13, № 1. – С.1-9.
236. Zhu P., Masuda Y., Koumoto K. The effect of surface charge on hydroxyapatite nucleation // *Biomaterials.* – 2004. – Т. 25, № 17. – С.3915–3921
237. Yang G., Lin W., Lai H., Tong J., Lei J., Yuan M., Cui C. Understanding the relationship between particle size and ultrasonic treatment during the synthesis of metal nanoparticles // *Ultrason Sonochem.* – 2021. – Т. 73. – 105497.
238. Ghiasi B., Sefidbakht Y., Mozaffari-Jovin S., Gharehcheloo B., Mehrarya M., Khodadadi A., Uskoković V. Hydroxyapatite as a biomaterial—a gift that keeps on giving // *Drug Development and Industrial Pharmacy.* – 2020. – Т. 46, № 7. – С.1035–1062.
239. Nguyen N., Leoni M., Maniglio D., Migliaresi C. Hydroxyapatite nanorods: Soft-template synthesis, characterization and preliminary in vitro tests // *J Biomater Appl.* – 2013. – Т. 28, № 1. – С.49–61.
240. Sreekumar S., Goycoolea F., Moerschbacher B., Rivera-Rodriguez G. Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano- and microparticles // *Scientific Reports.* – 2018. – Т. 8, № 1. – С.1–11.
241. Hussain Z., Sahudin S. Preparation, characterisation and colloidal stability of chitosan-tripolyphosphate nanoparticles: Optimisation of formulation and process parameters // *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* – 2016. – Т. 8, № 3. – С.297–308.
242. Skuredina A.A., Tychinina A.S., Le-Deygen I.M., Golyshev S.A., Kopnova T.Yu., Le N.T., Belogurova N.G., Kudryashova E. V. Cyclodextrins and Their Polymers Affect the Lipid Membrane Permeability and Increase Levofloxacin's Antibacterial Activity In Vitro // *Polymers.* – 2022. – Т. 14, № 21. – 4476.
243. Кудряшова Е.В., Суховерков К.В., Соколов Н.Н. Применение сополимеров ПЭГ-хитозана для регуляции каталитических свойств ферментных препаратов медицинского назначения на примере рекомбинантной L-аспарагиназы *Erwinia Carotovora* // *Биомедицинская химия.* – 2015. – Т. 61, № 4. – С.480–487.
244. Щукин, Е.Д. Коллоидная химия / Е.Д. Щукин, А.В. Перцов, Е.А. Амелина. – Москва: Высшая школа, 2004. – 445 с.

245. Khalfaoui M., Knani S., Hachicha M., Lamine A. New theoretical expressions for the five adsorption type isotherms classified by BET based on statistical physics treatment // *J Colloid Interface Sci.* – 2003. – T. 263, № 2. – C.350–356.
246. Wierenga P.A., Gruppen H. New views on foams from protein solutions // *Curr Opin Colloid Interface Sci.* – 2010. – T. 15, № 5. – C.365–373.
247. Moreno M., Campanelli J., Sande P., Sáenz D., Keller Sarmiento M., Rosenstein R. Retinal oxidative stress induced by high intraocular pressure // *Free Radic Biol Med.* – 2004. – T. 37, № 6. – C.803–812.