

УДК 546.185; 615.457; 617.7

ВКЛЮЧЕНИЕ ТИМОЛОЛА И ЛИЗИНОПРИЛА В КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫЕ ЧАСТИЦЫ, ПОКРЫТЫЕ ХИТОЗАНОМ: ПРИМЕНЕНИЕ В ОФТАЛЬМОЛОГИИ

И.И. Никольская¹, О.В. Безнос², А.И. Ельцов¹, И.В. Гачок¹, Н.Б. Чеснокова²,
В.П. Варламов³, О.А. Кост^{1*}

(¹Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; ²ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России; ³Институт биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН; *e-mail: olga.a.kost@gmail.com)

Получены и охарактеризованы кальций-фосфатные наночастицы, покрытые хитозаном, с включенными препаратами тимололом и лизиноприлом, имеющие размер 30–130 нм и ζ -потенциал $+22 \pm 4$ мВ. Исследование фазового состава частиц показало присутствие как аморфной фазы в виде аморфного фосфата кальция со строением $\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot z\text{H}_2\text{O}$, так и кристаллической структуры в виде гидратированной формы гидрофосфата кальция (брушит) со строением $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. В экспериментах *in vivo* показано, что включение тимолола в кальций-фосфатные частицы, покрытые хитозаном, приводит к значительной пролонгации эффекта снижения внутриглазного давления.

Ключевые слова: кальций-фосфатные частицы, фазовый состав, хитозан, тимолол, лизиноприл, внутриглазное давление.

Список сокращений: CaPh-частицы – кальций-фосфатные частицы, ВГД – внутриглазное давление, ТПФ – триполифосфат.

Известно, что при капельных инстилляциях только 1–5% лекарственного препарата проникает в переднюю камеру глаза [1]. Поэтому актуальная задача офтальмологии заключается в повышении проникновения лекарственных препаратов во внутренние среды глаза через барьер роговицы и пролонгации их действия. Для этого предлагалось использование комплексов лекарственных веществ с циклодекстринами [2], совместно с промутером (каприновой кислотой) [3], а также включение лекарственных препаратов в мукоадгезивные полимерные гели [4], липосомы [5], в сложные везикулы на основе поверхностно-активных веществ и масел или лецитина [6, 7] и наночастицы [8–10].

Среди наночастиц следует выделить кальций-фосфатные частицы (CaPh-частицы), поскольку они обладают такими неоспоримыми преимуществами перед другими носителями органического и неорганического происхождения, как их полная биосовместимость, нетоксичность, неиммуногенность и легкость получения в водной среде при нейтральных значениях pH [11]. Кроме того, ионы кальция и ионы фосфата относятся к структурным компонентам человеческого организма.

На сегодняшний день показана потенциальная возможность использования CaPh-частиц в медицине для трансфекции клеток [12–14],

создания эффективных вакцин [15], включения фотосенсибилизаторов для фототерапии при лечении рака [16]. Использование CaPh-частиц возможно и в качестве носителей лекарственных препаратов. Описано получение покрытых целлюлозой CaPh-частиц, содержащих блокаторы допаминовых рецепторов [17], β -блокатор тимолол [18], ингибитор ангиотензин-превращающего фермента (лизиноприл) [19], а также антиокислительный фермент (супероксиддисмутазу) (КФ 1.15.1.1) [20]. В экспериментах *in vivo* показано повышение эффективности этих препаратов по сравнению с их водными формами при снижении внутриглазного давления (ВГД) и уменьшении воспаления глаз. Однако частицы, покрытые целлюлозой, имели отрицательный заряд поверхности, что могло затруднять их проникновение через муциновый слой слезной пленки, также имеющий отрицательный заряд [21]. Можно предположить, что эффект действия препаратов в подобных системах можно улучшить, используя частицы с положительным ζ -потенциалом.

В качестве покрывающего агента для CaPh-частиц может быть использован положительно заряженный биосовместимый и биоразлагаемый биополимер – хитозан. Продукты деградации хитозана, такие как глюкозамин или N-ацетилглюкозамин, усваиваются в организме

[22]. Хитозан обладает мукоадгезивностью и способностью увеличивать проникновение больших молекул через слизистые поверхности [23], а наноразмерные частицы на основе хитозана способны преодолевать физиологические барьеры, в том числе барьер роговицы [24]. Использование хитозана в качестве покрывающего агента частиц открывает широкие возможности применения таких частиц в офтальмологии [25–27].

Цель данной работы – получение и характеристика покрытых хитозаном CaPh-частиц с включенными лекарственными препаратами, снижающими ВГД (β -блокатор тимолол и ингибитор ангиотензин-превращающего фермента (КФ 3.4.15.1) лизиноприлом), а также оценка эффективности полученных частиц с тимололом в экспериментах *in vivo*.

Методы

В работе использован хитозан пищевой (ООО «Биопрогресс»). Степень деацетилирования хитозана определяли методом кондуктометрического титрования [28], а средневязкостную молекулярную массу рассчитывали согласно [29] по результатам вискозиметрии. Измерение вязкости растворов хитозана проводили в вискозиметре Уббелодде (диаметр капилляра 0,5 мм) при температуре 30 °С. В качестве растворителя использовали раствор, содержащий уксусную кислоту и ацетат натрия в концентрации 0,2 и 0,1 М соответственно.

CaPh-частицы получали по методике [18], используя эквимольные количества Na_2HPO_4 и CaCl_2 (12,5 мМ), при pH 6,8 и температуре +4 °С.

Включение тимолола ((S)-1-(терт-бутиламино)-3-[(4-морфолино-4-ил-1,2,5-тиадиазол-3-ил)окси]пропан-2-ол; «Диафарм», Россия) и лизиноприла (N^2 -[(1S)-1-карбоксит-3-фенилпропил]-L-лизил-L-пролин; «Sigma», США) в частицы проводили на стадии получения CaPh-частиц с последующим покрытием их хитозаном. Для этого необходимое количество препарата добавляли к исходному раствору Na_2HPO_4 и цитрата натрия (pH 6,8) для получения определенной конечной концентрации (1% лизиноприл или 0,5% тимолол).

Для покрытия частиц хитозаном к исходной суспензии, содержащей CaPh-частицы, при комнатной температуре и при постоянном интенсивном перемешивании добавляли водный раствор 1 мг/мл хитозана в объемном соотношении между исходной суспензией и раствором хитозана 2:1. Затем по каплям добавляли водный раствор

1 мг/мл триполифосфата натрия (ТПФ) фирмы «Acros» (США) при массовых соотношениях хитозана и ТПФ от 1:1 до 1:0,09. Предварительно раствор хитозана пропускали через фильтр «Millipore» с диаметром пор 0,45 мкм, а раствор ТПФ через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. После добавления ТПФ смесь оставляли перемешиваться на ночь при комнатной температуре.

Исследование фазового состава CaPh-частиц проводили методом рентгеноспектрального микроанализа. Для этого 20 мл суспензии частиц несколько раз отмывали от избытка солей фильтрацией на фильтрах «Microcon 30 кДа» с последующим разбавлением 0,1 М NaCl, после чего частицы лиофильно высушивали. Далее образцы помещали в вакуумную камеру растрового микроскопа «LEO Supra» («Carl Zeiss», Германия), оборудованного рентгеновским спектрометром с энергетической дисперсией X-Max («Oxford Instruments», Великобритания), и облучали сфокусированным пучком электронов с энергией более 20 кэВ.

Определение размера и поверхностного заряда (ζ -потенциала) частиц проводили методом динамического светорассеяния на многофункциональном приборе «ZetasizerNanoZS» («Malvern Instrument», Великобритания) в специализированных кюветах при температуре ячейки 25 °С. Перед анализом суспензию частиц фильтровали через фильтры «Millipore» с диаметром пор 0,45 мкм. Также анализировали нефилтрованный образец. Результаты обрабатывали с помощью программы Zetasizer v.7.03 (проводили вычисления на основе приборных данных и статистический анализ).

Эффективность включения лизиноприла и тимолола в CaPh-частицы оценивали следующим образом. Частицы, содержащие лекарственные препараты, отделяли от раствора фильтрацией через мембраны «Microcon 30 кДа» при центрифугировании (9000 g) в течение 5 мин. Определяли количество препарата, не связанного с частицами, в прошедшем через мембрану растворе. Концентрацию тимолола определяли по оптической плотности его растворов при длине волны $\lambda = 295$ нм. Коэффициент молярного поглощения тимолола $\epsilon_{295} = 6300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ был определен нами в результате независимого эксперимента. Концентрацию лизиноприла определяли по методике [30], основанной на реакции взаимодействия свободной аминогруппы ингибитора с *орто*-фталевым альдегидом и N-ацетил-L-цистеином с образованием хромофорного со-

единения, имеющего максимум поглощения при длине волны 340 нм. Коэффициент молярного поглощения хромофора был определен нами в результате независимого эксперимента и составил $\epsilon_{340} = 6650 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Все измерения проводили на микропланшетном ридере «Tecan Infinite® M200» (Швейцария).

Изучение времени десорбции лизиноприла и тимолола из частиц в экспериментах *in vitro* проводили следующим образом. На шесть мембран «Mісгосоп 30 кДа» помещали по 0,5 мл суспензии CaPh-частиц в 0,15 М растворе NaCl и осаждали частицы центрифугированием при 9000 g в течение 5 мин. Затем объем одновременно довели до первоначального (0,5 мл) 0,15 М раствором NaCl и суспензии инкубировали в течение различных промежутков времени от 5 до 60 мин при комнатной температуре, после чего каждый раствор вновь центрифугировали. Количество высвободившегося препарата определяли в фильтрах, как указано выше.

Стабильность частиц оценивали по отсутствию изменения их размера и величины поверхностного заряда при хранении в физиологическом растворе (4 °C), в лиофильно высушенном состоянии и при концентрировании на фильтрах.

Для экспериментов *in vivo* полученные нами тимололсодержащие CaPh-частицы, покрытые хитозаном, были сконцентрированы в 10 раз на фильтрующих мембранах «Mісгосоп 30 кДа». Эффективность физиологического действия тимолола в частицах сравнивали с эффективностью раствора тимолола в 0,15 М растворе NaCl. Оценивали величину изменения внутриглазного давления (ВГД) и продолжительность действия препаратов на здоровых кроликах породы шиншилла массой 2–2,5 кг. Животные были разделены на две группы по 3 кролика (6 глаз в каждой группе). Опытная группа получала однократные инстилляции в каждый глаз по 30 мкл 0,5%-го тимолола, включенного в CaPh-частицы, покрытые хитозаном, контрольные – однократные инстилляции в каждый глаз по 30 мкл 0,5%-го тимолола в физиологическом растворе. ВГД измеряли по стандартной методике Маклакова (тонометром Маклакова) после предварительной двукратной инстилляцией 0,4%-м раствором местного анестетика инокаина. У всех кроликов до начала экспериментов измеряли ВГД ежедневно в течение двух недель, чтобы животные привыкли к процедуре и для определения диапазона нормальных значений ВГД. Достоверность полученных результатов оценивали по U-критерию Манна–Уитни.

Результаты и их обсуждение

CaPh-частицы с включенными тимололом и лизиноприлом, но без покрытия хитозаном, характеризуются отрицательным ζ -потенциалом –7 мВ. Для покрытия частиц положительно заряженным хитозаном используют метод ионотропного гелеобразования, при котором необходимо добавлять дополнительные вспомогательные реагенты, имеющие несколько отрицательно заряженных групп, например ТПФ [31]. В каждом конкретном случае, в зависимости от природы и характеристик используемого хитозана, необходимо подбирать соотношение хитозана и ТПФ, поскольку от этого зависят как ζ -потенциал, так и размер получаемых частиц.

Для использованного в работе пищевого хитозана мы определили средневязкостный молекулярный вес (85 кДа) и степень деацетилирования (89%). Результаты по влиянию весового соотношения хитозана и ТПФ (от 1:1 до 1:0,09) при фиксированной концентрации солей на характеристики получаемых частиц представлены в табл. 1. Видно, что при полном отсутствии или недостаточном количестве ТПФ значения ζ -потенциала остаются отрицательными, а при избыточном количестве ТПФ происходит агрегирование частиц. В результате для дальнейшей работы было определено оптимальное соотношение хитозан:ТПФ, равное 1:0,14, при котором происходило образование частиц с положительным ζ -потенциалом +22 мВ.

Методом рентгеноспектрального микроанализа проведено исследование фазового состава CaPh-частиц. Предварительно были получены снимки растровой электронной микроскопии, отдельные области которых и стали объектом для спектрального исследования (рис. 1). В результате анализа полученных данных в CaPh-частицах было выявлено присутствие аморфной фазы, для которой соотношение Ca:P состав-

Таблица 1

Влияние весового соотношения между хитозаном и ТПФ на характеристики CaPh-частиц

Хитозан:ТПФ	<i>r</i> , нм	ζ , мВ
1:1	>1000	–
1:0,25	>1000	–
1:0,14	70±40	+22±4
1:0,09	44±15	–6±4
Без ТПФ	40±15	–6±4

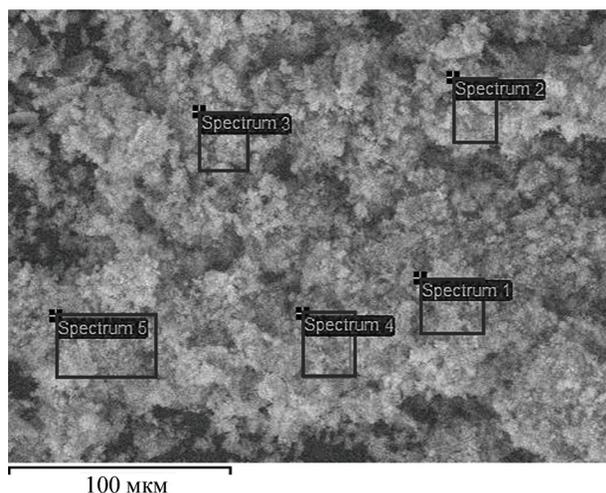


Рис. 1. Изображения, полученные методом растровой электронной микроскопии с разным разрешением (данные рентгеноспектрального микроанализа получали из областей, помеченных на рисунке рамками)

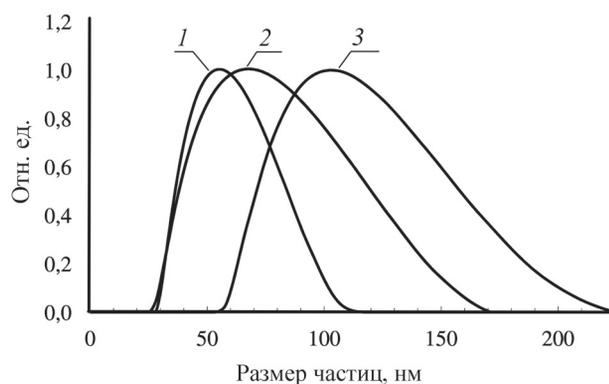


Рис. 2. Распределение по размерам CaPh-частиц, покрытых хитозаном и целлобиозой, по результатам динамического светорассеяния (1 – CaPh-частицы, покрытые хитозаном, фильтр 0,45 мкм; 2 – CaPh-частицы, покрытые хитозаном, нефильтрованный образец; 3 – CaPh-частицы, покрытые целлобиозой, нефильтрованный образец)

ляет порядка $1,3 \pm 0,1$ и которая представляет собой аморфный фосфат кальция со строением $Ca_x(PO_4)_y \cdot zH_2O$. Другая, присутствующая в данных наночастицах, фаза имеет соотношение Ca:P, равное ~ 1 , что можно отнести к гидрати-

рованной форме гидрофосфата кальция, т.е. брушиту ($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$), который обладает кристаллической структурой.

Анализ размера частиц методом динамического светорассеяния проводили как для растворов нефильтрованных частиц, так и растворов, профильтрованных через фильтры 0,45 мкм (рис. 2). Оказалось, что при использовании хитозана в качестве покрывающего агента образуются преимущественно наночастицы (30–130 нм), в то время как ранее при покрытии CaPh-частиц целлобиозой было показано присутствие частиц большего размера с радиусом до 230 нм [19].

В качестве лекарственных препаратов для включения в CaPh-частицы были выбраны широко применяемый в офтальмологии β -блокатор тимолол (316 Да) и ингибитор ангиотензин-превращающего фермента лизиноприл (405 Да), который также снижает ВГД [32]. Показано, что включение препаратов не изменяет размер и очень слабо изменяет ζ -потенциал частиц. При этом эффективность включения лизиноприла в CaPh-частицы в 7,5 раз превышает эффективность включения тимолола (табл. 2), что свидетельствует о большем сродстве лизиноприла к CaPh-частицам. Ранее [19] при включении тех же препаратов в CaPh-частицы, покрытые целлобиозой, также наблюдалась большая (в 2 раза) эффективность лизиноприла по сравнению с тимололом.

Размер и ζ -потенциал CaPh-частиц, покрытых хитозаном, с включенными тимололом и лизиноприлом не изменялись при хранении как в растворе при 4 °С, так и в лиофильно высушенном состоянии при –20 °С не менее 3 мес. Частицы оставались стабильными также и при их концентрировании в 20 раз.

Определение времени десорбции включенных в частицы препаратов при внесении частиц в свежий солевой раствор показало, что уже через короткий промежуток времени (примерно 30 мин для лизиноприла и 5 мин для тимолола) наблюдалась почти полная ($\sim 90\%$) десорбция.

Таблица 2

Характеристики CaPh-частиц, покрытых хитозаном, с включенными лекарственными препаратами

CaPh-частица	r, нм	ζ , мВ	Включение препарата, %
CaPh-Хитозан/ТПФ	70±40	+22±4	–
CaPh/Лизиноприл-Хитозан/ТПФ	65±40	+17±4	75±9
CaPh/Тимолол-Хитозан/ТПФ	70±40	+16±4	10±4

Более медленное высвобождение лизиноприла по сравнению с тимололом также может свидетельствовать о более сильном его связывании с CaPh-частицами. С другой стороны, возможны дополнительные взаимодействия между отрицательно заряженными карбоксильными группами лизиноприла с положительно заряженными аминогруппами хитозана, в то время как для тимолола таких взаимодействий быть не может.

В экспериментах *in vivo* проникновение во внутренние структуры глаза лекарственных препаратов, включенных в частицы, их эффективность и продолжительность действия можно объективно оценить путем включения в частицы препаратов, снижающих ВГД. Этот показатель можно многократно измерять у одного и того же животного в течение необходимого для исследования времени и таким образом количественно оценивать динамику гипотензивного эффекта. Адекватную модель глаукомы у животных воспроизвести невозможно, а имеющиеся модели глазной гипертензии не отражают процессы, протекающие при глаукоме. Поэтому для оценки гипотензивного действия различных препаратов принято использовать нормотензивных кроликов, поскольку физиологическое действие на них гипотензивных средств больше соответствует действию этих препаратов на больных глаукомой [33].

Для экспериментов *in vivo* нами были использованы CaPh-частицы, покрытые хитозаном, содержащие тимолол. На рис. 3 представлены данные по снижению ВГД при инстилляциях в глаза

кроликов раствора тимолола и суспензии CaPh-частиц, содержащих тимолол и покрытых хитозаном. Снижение ВГД под влиянием тимолола в частицах происходило несколько медленнее, чем под влиянием простого раствора тимолола. Это может быть связано с тем, что хитозан обладает высокими мукоадгезивными свойствами и может при введении депонироваться в слизистых оболочках [23]. При закапывании в глаз частицы контактируют со слизистой конъюнктивы и муциновым слоем слезной пленки, где и могут задерживаться, что, в свою очередь, может приводить к некоторому замедлению поступления препарата во внутренние структуры глаза. Однако уже через 4–5 ч после введения препаратов уровень ВГД становился одинаковым. Наиболее важным результатом является значительное пролонгирование действия тимолола в составе CaPh-частиц. Если после закапывания водного раствора тимолола величина ВГД через 6 ч практически возвращалась к исходным значениям, то при закапывании препарата, введенного в частицы, этот показатель и через 8 ч оставался статистически достоверно пониженным ($p < 0,01$) (рис. 3). Можно полагать, что CaPh-частицы, содержащие тимолол и покрытые хитозаном, не так быстро вымываются с поверхности глаза, как низкомолекулярный тимолол, и в течение продолжительного периода времени могут поставлять лекарственный препарат во внутренние структуры глаза, поддерживая там достаточно высокую концентрацию для снижения ВГД. Возвращение ВГД к исходному уров-

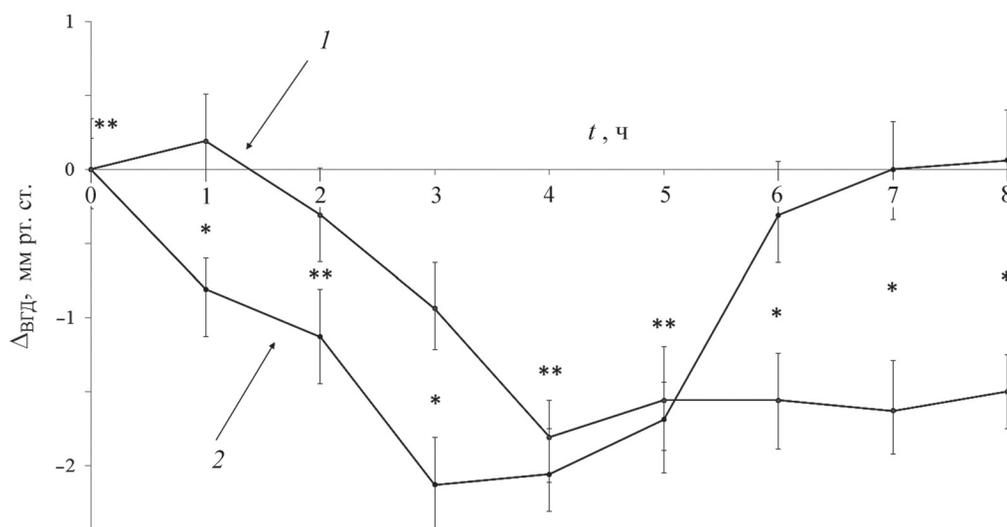


Рис. 3. Среднее изменение ВГД после однократной инстилляцией тимолола в составе CaPh-частиц, покрытых хитозаном (опыт), и в водной форме (контроль). Звездочкой отмечены статистически достоверные различия ($p \leq 0,05$) (1 – тимолол в составе CaPh-частиц, покрытых хитозаном, 2 – тимолол в растворе)

ню после инстилляции тимолола в составе CaPh-частиц, покрытых хитозаном, отмечено через 24 ч. Следует отметить, что включение тимолола в CaPh-частицы, покрытые не хитозаном, а целлобиозой, не приводило к пролонгации действия препарата [18]. Таким образом, несмотря на низкий процент включения тимолола в CaPh-частицы при их покрытии хитозаном и быстрый выход препарата в экспериментах *in vitro*, этот подход позволяет достигнуть значительного положительного эффекта в экспериментах *in vivo* при снижении ВГД.

Таким образом, в настоящей работе получены и охарактеризованы CaPh-частицы, содержащие

лекарственные низкомолекулярные препараты и покрытые хитозаном. Использование хитозана в виде покрывающего агента приводит к значительной пролонгации гипотензивного действия внедренного в CaPh-частицы тимолола как по сравнению с его действием в виде простого раствора, так и по сравнению с его действием в составе CaPh-частиц, покрытых целлобиозой. Это указывает на высокую эффективность CaPh-частиц, покрытых хитозаном, как носителей лекарственных препаратов для их доставки во внутренние среды глаза, что может позволить снизить дозу и частоту применения лекарственного препарата.

Получение хитозанов проводилось при поддержке Российского научного фонда (проект РНФ № 16-14-00046).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Achouri D., Alhanout K., Piccerelle Ph., Andrieu V. // Drug Dev. Ind. Pharm. 2013. Vol. 39. N 11. P. 1599.
2. Saari K.M., Nelimarkka L., Ahola V., Loftsson T., Stefansson E. // Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 2006. Vol. 244. N 5. P. 620.
3. Sasaki H., Igarashi Y., Nagano T., Nishida K., Nakamura J. // Pharm. Res. 1995. Vol. 12. N 8. P. 1146.
4. Ludwig A. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2005. Vol. 57. N 11. P. 1595.
5. Shen Y., Tu J. // AAPS Journal. 2007. Vol. 9. N 3. P. E 371.
6. Abdelbary G.A., Amin M.M., Zakaria M.Y. // Drug Deliv. 2017. Vol. 24. N 1. P. 309.
7. Naguib S.S., Hathout R.M., Mansour S. // Drug Deliv. 2017. Vol. 24. N 1. P. 99.
8. Sahoo SK., Dilnawaz F., Krishnakumar S. // Drug Discov. Today. 2008. Vol. 13. N 3-4. P. 144.
9. Ogunjimi A.T., Melo S.M., Vargas-Rechia C.G., Emery F.S., Lopez R.F. // Carbohydr. Polym. 2017. Vol. 157. P. 1065.
10. Figueiro J.F., Veiga F., Silva A.M., Souto E.B. // Curr. Pharm. Des. 2016. Vol. 22. N 9. P. 1135.
11. Пат. США. 2002. № 6355271 B1.
12. Hu J., Kovtun A., Tomaszewski A., Singer B., Seitz B., Epple M., Steuhl K., Ergün S., Fuchsluger T. // Acta Biomater. 2012. Vol. 8. N 3. P. 1156.
13. Xie Y., Chen Y., Sun M., Ping Q. // Curr. Pharm. Biotechnol. 2013. Vol. 14. N 10. P. 918.
14. Liu Y., Wang T., He F., Liu Q., Zhang D., Xiang S., Su S., Zhang J. // Int. J. Nanomedicine. 2011. Vol. 6. P. 721.
15. Viswanathan K., Gopinath V.P., Raj G.D. // Colloids Surf. B. Biointerfaces. 2014. Vol. 116. P. 9.
16. Schwierz J., Wiehe A., Gräfe S., Gitter B., Epple M. // Biomaterials. 2009. Vol. 30. N 19. P. 3324.
17. He Q., Chu T.-C., Potter D. // J. Ocul. Pharmacol. Ther. 2002. Vol. 18. N 6. P. 507.
18. Шимановская Е.В., Безнос О.В., Клячко Н.Л., Кост О.А., Никольская И.И., Павленко Т.А., Чеснокова Н.Б., Кабанов А.В. // Вестн. Офтальмол. 2012. № 3. С. 15.
19. Шимановская Е.В., Никольская И.И., Биневский П.В., Безнос О.В., Клячко Н.Л., Павленко Т.А., Чеснокова Н.Б., Кост О.А. // Рос. Нанотехнол. 2014. Т. 9. № 3-4. С. 100.
20. Никольская И.И., Безнос О.В., Галицкий В.А., Чеснокова Н.Б., Кост О.А. // Вестн. Моск. ун-та. 2016. № 3. С. 138.
21. Liaw J., Rojanasakul Y., Robinson J.R. // Int. J. Pharm. 1992. Vol. 88. P. 111.
22. Хитозан / Под ред. К.Г. Скрябина, С.Н. Михайлова, В.П. Варламова. М., 2013.
23. Menchicchi B., Fuenzalida J.P., Bobbili K.B., Hensel A., Swamy M.J., Goycoolea F.M. // Biomacromol. 2014. Vol. 15. N 10. P. 3550.
24. Da Silva S.B., Ferreira D., Pintado M., Sarmiento B. // Int. J. Biol. Macromol. 2015. Vol. 84. P. 112.
25. De Campos A.M., Sanchez A., Gref R., Calvo P., Alonso M.J. // Eur. J. Pharm. Sci. 2003. Vol. 20. N 1. P. 73.
26. Costa J.R., Silva N.C., Sarmiento B., Pintado M. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2015. Vol. 34. N 6. P. 1255.
27. Nagarwal R.C., Kumar R., Pandit J.K. // Eur. J. Pharm. Sci. 2012. Vol. 47. N 4. P. 678.
28. Raymond L., Morin F.G., Marchessault R.H. // Carbohydrate Res. 1993. Vol. 246. P. 331.
29. Wang W., Bo S., Li S., Qin W. // Int. J. Biol. Macromol. 1991. Vol. 13. N 5. P. 281.
30. Svedas V., Galaev I., Borisov I., Berezin I. // Anal. Biochem. 1980. Vol. 101. N 1. P. 188.
31. Xu Y., Du Y. // Int. J. Pharm. 2003. Vol. 250. N 1. P. 215.
32. Чеснокова Н.Б., Кост О.А., Никольская И.И., Безнос О.В., Давыдова Н.Н., Столярова Е.А., Биневский П.А., Павленко Т.А. // Рос. Офтальмол. Журн. 2009. Т. 2. С. 42.
33. Orihashi M., Shima Y., Tsuneki H., Kimura I. // Jpn J. Ophthalmol. 2005. Vol. 49. N 6. P. 523.

THE INCLUSION OF TIMOLOL AND LISINOPRIL INTO CALCIUM PHOSPHATE PARTICLES COVERED BY CHITOSANE: APPLICATION IN OPHTHALMOLOGY

I.I. Nikolskaya¹, O.V. Beznos², A.I. Eltsov¹, I.V. Gachok¹, N.B. Chesnokova², V.P. Varlamov³, O.A. Kost^{1*}

(¹ Chemistry Faculty, Lomonosov Moscow State University; ² Helmholtz Institute for Eye Diseases; ³ Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" e-mail: olga.a.kost@gmail.com)

Chitosane-covered calcium phosphate nanoparticles with the mean dynamic radii 30–130 nm and ζ -potential $+22\pm 4$ mV, containing timolol and lisinopril, were obtained and characterized. These particles were formed by amorphous phase represented by amorphous calcium phosphate $\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot z\text{H}_2\text{O}$ and crystalline phase represented by hydrated calcium hydrophosphate (brushite) $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. In the experiments *in vivo*, it was demonstrated that the inclusion of timolol into calcium phosphate particles covered by chitosane caused substantial prolongation of its effect on the intraocular pressure.

Key words: calcium phosphate particles, phase composition, chitosane, timolol, lisinopril, intraocular pressure.

Сведения об авторах: Никольская Ирина Ивановна – ст. науч. сотр. химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (iinikolskaya@yandex.ru); Безнос Ольга Валерьевна – науч. сотр. ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней имени Гельмгольца» Минздрава России. РФ (olval2011@mail.ru); Ельцов Александр Игоревич – студент химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (ealex21@gmail.com); Гачок Ирина Владимировна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (ivgachok@gmail.com); Чеснокова Наталья Борисовна – профессор ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней имени Гельмгольца» Минздрава РФ, докт. биол. наук (nchesnokova2012@yandex.ru); Варламов Валерий Петрович – профессор ФГБУ ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН, докт. хим. наук (varlamov@biengi.ac.ru); Кост Ольга Алексеевна – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (olga.a.kost@gmail.com).