

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 615.45; 617.72

**ХИТОЗАНОВЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ – СИСТЕМА ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ
В ПЕРЕДНИЙ ОТДЕЛ ГЛАЗА**

Екатерина Васильевна Попова¹, Виктория Евгеньевна Тихомирова², Ольга Валерьевна Безнос³, Юрий Васильевич Григорьев⁴, Наталья Борисовна Чеснокова⁵, Ольга Алексеевна Кост⁶

^{1,2,6} Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет;

^{3,5} НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России;

⁴ Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова, Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» РАН

Автор, ответственный за переписку: Ольга Алексеевна Кост, olga.a.kost@gmail.com

Аннотация. Эффективность проникновения лекарств во внутренние ткани глаза при местном применении значительно ограничена барьерным действием роговицы глаза и смывом препарата слезной жидкостью. Для повышения биодоступности лекарственного средства предложено включение препарата в хитозановые частицы на основе двух видов хитозана – 5 кДа хитозана и 72 кДа гликоль-хитозана. Хитозановые частицы с внедренным ингибитором ангиотензин-превращающего фермента эналаприлатом, снижающим внутриглазное давление, охарактеризованы методами динамического светорассеяния и растровой электронной микроскопии. Частицы, образованные 5 кДа хитозаном, обладали средним гидродинамическим диаметром 85–125 нм и положительным ζ -потенциалом $+21 \pm 3$ мВ, а частицы, образованные 72 кДа гликоль-хитозаном, имели размер 440–480 нм и характеризовались ζ -потенциалом $+10 \pm 2$ мВ. Процент включения эналаприлата в хитозановые частицы составил 25 и 40% соответственно. В экспериментах *in vivo* продемонстрировано, что включение препарата в хитозановые частицы позволяет увеличить время удерживания эналаприлата в слезной пленке кроликов.

Ключевые слова: мукоадгезивность, хитозан, ингибитор ангиотензин-превращающего фермента, внутриглазное давление, доставка в глаз, слезная жидкость

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-2-141-151

Список сокращений: ВГД – внутриглазное давление, ТПФ – триполифосфат натрия, АПФ – ангиотензин-превращающий фермент, Cbz-Phe-His-Leu – N-карбобензоксиг-L-фенилаланил-L-гистидил-L-лейцин, РЭМ – растровая электронная микроскопия, ДСР – динамическое светорассеяние.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (Регистрационная тема 121041500039-8), НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца (Регистрационная тема НИОКТР АААА-А21-121011190061-1), а также Министерства науки и высшего образования в рамках государственного задания ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН.

Для цитирования: Попова Е.В., Тихомирова В.Е., Безнос О.В., Чеснокова Н. Б., Григорьев Ю.В, Кост О.А. Хитозановые наночастицы – система доставки лекарств в передний отдел глаза // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. Т. 64. № 1. С. 141–151.

ORIGINAL ARTICLE

CHITOSAN NANOPARTICLES – THE DRUG DELIVERY SYSTEM TO THE ANTERIOR SEGMENT OF THE EYE

Ekaterina V. Popova¹, Victoria E. Tikhomirova², Olga V. Beznos³, Natalia B. Chesnokova⁴, Yuri V. Grigoriev⁵, Olga A. Kost⁶

^{1,2,6} M.V. Lomonosov Moscow State University, Chemistry Faculty

^{3,5} Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases

⁴ Shubnikov Institute of Crystallography, Federal Scientific Research Center Crystallography and Photonics, Russian Academy of Sciences

Corresponding author: Olga A. Kost, olga.a.kost@gmail.com

Abstract. The effectiveness of drug penetration into the inner tissues of the eye is significantly limited by the barrier effect of the cornea and by the washing out of a drug with tear fluid. To increase the bioavailability of the drug, it was proposed to include the drug in chitosan particles formed by two types of chitosan – 5 kDa chitosan and 72 kDa glycol-chitosan. Chitosan particles with incorporated angiotensin-converting enzyme inhibitor enalaprilat, capable to reduce intraocular pressure, were characterized by dynamic light scattering and scanning electron microscopy. Particles formed by 5 kDa chitosan had an average hydrodynamic diameter of 85–125 nm and a positive ζ -potential of $+21 \pm 3$ mV, while particles formed by 72 kDa glycol-chitosan were 440–480 nm by size and had ζ -potential of $+10 \pm 2$ mV. The percentage of inclusion of enalaprilat in chitosan particles was 25% and 40%, respectively. *In vivo* experiments have shown that the inclusion of the drug in chitosan particles increased the retention time of enalaprilat in the lacrimal fluid of rabbits.

Keywords: mucoadhesiveness, chitosan, angiotensin-converting enzyme inhibitor, intraocular pressure, delivery to the eye, lacrimal fluid

Financial Support. The work was carried out with the financial support of the Lomonosov Moscow State University (Registration theme 121041500039-8), NMIC of Eye Diseases named after M.V. Lomonosov. Helmholtz (Registration theme AAAA21-121011190061-1), as well as the Ministry of Science and Higher Education within the framework of the state task of the Federal Research Institute “Crystallography and Photonics” of the Russian Academy of Sciences.

For citation: Popova E.V., Tikhomirova V.E., Beznos O.V., Chesnokova N.B., Grigoriev Yu.V., Kost O.A. Chitosan Nanoparticles – the Drug Delivery System to the Anterior Segment of the Eye // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. T. 64. № 2. P. 141–151.

Местное введение лекарственных препаратов в форме глазных капель – наиболее распространенный, доступный для пациента, эффективный и экономичный способ терапии глазных болезней. Однако традиционные глазные лекарственные формы обладают низкой биодоступностью и сродством к эпителию роговицы, вследствие чего они быстро выводятся с поверхности глаза [1]. Из-за низкой проницаемости, моргания, смыва

слезой и деградации тканевыми ферментами роговицы и склеры во внутренние среды глаза проникает не более 5% введенного препарата [2–4]. Для повышения биодоступности лекарств при местном введении применяются две основные стратегии: увеличение времени прекорнеальной задержки препарата и облегчение проникновения лекарственного средства через роговицу, склеру или конъюнктиву [5].

Разработанные на данный момент наноразмерные системы доставки лекарств, в частности наночастицы, способны не только продлевать время контакта препарата с тканями глаза, но и осуществлять доставку к конкретной ткани в контролируемом режиме, защищать лекарства от деградации и метаболизма, поддерживать высвобождение лекарств из носителя в течение длительного времени, снижать токсичность и побочные эффекты, а также увеличивать срок хранения [6–11].

Мукоадгезивность [12, 13] и положительный заряд [14] хитозана делают его перспективным материалом для синтеза носителей лекарственных препаратов для применения в офтальмологии. Однако практическое использование хитозана затруднено, прежде всего, из-за низкой растворимости хитозана в воде. Обычно разные виды хитозана легко растворяются в кислой среде [15, 16], но такие растворы непригодны для применения в офтальмологии из-за раздражающего действия кислых сред на поверхность глаза. Кроме того, в средах со значениями pH, близкими к физиологическому значению 7,4, хитозановые частицы могут осаждаться из суспензии.

С учетом вышесказанного мы выбрали для синтеза частиц два перспективных вида хитозана, способных растворяться при более высоких значениях pH [17, 18], а именно, низкомолекулярный хитозан со средней молекулярной массой 5 кДа в форме лактата и производное хитозана – гликоль-хитозан со средней молекулярной массой 72 кДа. В качестве лекарственной субстанции для включения в наночастицы был выбран низкомолекулярный ингибитор ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) эналаприлат (348 Да), способный снижать внутриглазное давление (ВГД) у кроликов при местном применении в виде инстилляций [19–24]. Ранее мы продемонстрировали возможность внедрения низкомолекулярных соединений в неорганические частицы на основе фосфата кальция [25, 26], а также в кальций-фосфатные частицы, покрытые хитозаном [27, 28].

В настоящей работе получены и охарактеризованы частицы с включенным в них ингибитором АПФ эналаприлатом, образованные двумя видами хитозана – 5 кДа хитозаном и 72 кДа гликоль-хитозаном, и показана перспективность полученных препаратов для применения в офтальмологии.

Материалы и методы

Материалы. В настоящей работе использовали следующие реагенты: гликоль-хитозан – степень

деацетилирования $\geq 60\%$, средняя молекулярная масса 72 кДа и 5 кДа хитозан – степень деацетилирования $>90\%$, средняя молекулярная масса 5 (4–6) кДа («Sigma», США); ортофталевый альдегид (ОФА) и N-ацетил-L-цистеин; триполифосфат натрия (ТПФ) («Acros», США); эналаприлат (S)-1-[N-(1-карбокси-3-фенилпропил)-L-аланил]-L-пролин («U.S. Pharmacopeial Convention», США); N-карбобензоксид-L-фенилаланил-L-гистидил-L-лейцин (Cbz-Phe-His-Leu) («Bachem», США).

АПФ выделен нами из легких быка методом аффинной хроматографии на лизиноприл-сефарозе по методу [29, 30].

Все используемые для синтеза хитозановых частиц растворы были приготовлены на деионизованной воде, полученной на установке «Simplicity UV» («Merck Millipore», Германия), и предварительно отфильтрованы с помощью фильтров, имеющих диаметр пор 0,45 мкм («Millipore», Германия), для раствора ТПФ использовали фильтры с порами 0,2 мкм.

Получение частиц на основе хитозана проводили следующим образом. Водный раствор 5 кДа хитозана готовили с концентрацией 1 мг/мл и доводили pH до 5,0 или 6,0. Растворы 72 кДа гликоль-хитозана готовили в трех разных концентрациях (1,0; 1,5 и 2,0 мг/мл) и доводили pH до 7,1. Затем к растворам 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 разные соотношения хитозана и ТПФ – 1:0,25; 1:0,2; 1:0,15 и 1:0,1 (объем/объем). После добавления ТПФ смесь оставляли перемешиваться на ночь при комнатной температуре.

Эффективность образования хитозановых частиц оценивали по схеме, приведенной ниже. Суспензию хитозановых частиц (500 мкл) помещали на фильтры «Sartorius» с размером пор 30 и 100 кДа для 5 кДа хитозана и 72 кДа гликоль-хитозана соответственно, концентрировали при 5400 g до минимального объема (25 мкл). Затем доводили сконцентрированную суспензию деионизованной водой до 100 мкл. В суспензии определяли концентрацию хитозана по реакции взаимодействия свободных аминогрупп хитозана с ОФА и N-ацетил-L-цистеином с образованием хромофорного соединения [31]. Измеряли оптическое поглощение раствора на многофункциональном ридере «Tecan Infinite M200» (Австрия) при длине волны 340 нм через 40 мин после начала реакции.

Эффективность образования хитозановых частиц рассчитывали как отношение массы хитозана в образце к общей внесенной массе при синтезе частиц.

Определение размера и поверхностного заряда (ζ -потенциала) частиц проводили методом динамического светорассеяния (ДСР) на установке «Zetasizer Nano ZS» («Malvern Instrument», Великобритания). Ячейку термостатировали при температуре 25 °С. Измерение гидродинамического диаметра и индекса полидисперсности PDI осуществляли в полистирольных кюветах в 6 мМ растворе KCl, а измерение ζ -потенциала проводили в воде в специализированной U-образной кювете с золотыми электродами («Malvern Instrument», Великобритания).

Результаты были автоматически обработаны с помощью программы Zetasizer v.7.03. Представлены средние как минимум из трех значений размера и ζ -потенциала частиц.

Исследование морфологии хитозановых частиц проводили методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) с использованием двухлучевого автоэмиссионного растрового электронно-ионного микроскопа «Scios» (1–30 кВ) («FEI», США). Образцы предварительно диализовали против деионизированной воды и затем лиофилизировали на проводящем двустороннем углеродном скотче.

Включение эналаприлата в хитозановые частицы проводили во время их получения. Для этого необходимое количество препарата добавляли к исходному раствору хитозана и готовили частицы методом, описанным выше. Конечная концентрация препарата в суспензии частиц составляла 2,2 мМ.

Степень включения эналаприлата в частицы определяли по нижеприведенной методике. Суспензию частиц (500 мкл) с внедренным эналаприлатом помещали на фильтры «Sartorius» с размером пор 30 и 100 кДа для 5 кДа хитозана и 72 кДа гликоль-хитозана соответственно, а затем концентрировали в 10 раз (до 50 мкл) при 5400 g в течение 5 мин. Количество несвязанного с частицами эналаприлата определяли в прошедшем через мембрану растворе путем сравнения ингибирующего действия исследуемых образцов на активность АПФ с действием контрольных растворов эналаприлата, как описано в [28]. Предварительно определяли зависимость остаточной активности АПФ (%) от концентрации контрольного раствора эналаприлата и строили калибровочную кривую. Актив-

ность АПФ определяли по начальной скорости гидролиза субстрата Cbz-Phe-His-Leu, измеряя на микропланшетном ридере «Tecan Infinite M200» скорость накопления продукта реакции His-Leu с помощью ОФА [32].

Кинетика десорбции препарата in vitro. Для определения времени перехода препарата из частиц в раствор 500 мкл суспензии частиц концентрировали в 10 раз при 5400 g на фильтрах «Sartorius» с размером пор 30 кДа для удаления свободного эналаприлата. Далее объем над мембранами доводили до первоначального (500 мкл) 0,15 М раствором NaCl, доведенного до pH 7,5, и инкубировали в течение разных промежутков времени при комнатной температуре, а затем вновь центрифугировали при 5400 g в течение 5 мин. В прошедших через мембраны фильтрах определяли количество высвободившегося эналаприлата. Эксперименты по определению кинетики десорбции внедряемого в частицы эналаприлата проводили не менее двух раз. Математический анализ экспериментальных кинетических кривых осуществляли с помощью известных математических моделей (первого порядка, Хигучи, Хиксона–Кроуэлла, Корсмейера–Пеппаса) [33], описывающих высвобождение лекарственных веществ из матриц разной химической природы.

Определение «времени жизни» эналаприлата в составе слезной пленки глаз кроликов. Проведены три независимые серии экспериментов по определению времени нахождения свободного эналаприлата в слезе кроликов, а также эналаприлата в составе хитозановых частиц, образованных 5 кДа хитозаном и 72 кДа гликоль-хитозаном. В экспериментах были задействованы здоровые кролики породы шиншилла массой 2,0–2,5 кг. В каждом эксперименте 18 кроликов случайным образом делили на шесть групп по три животных (6 глаз) в каждой. Всем животным в оба глаза однократно закапывали по 50 мкл эналаприлата (36 мкМ) в 12,5 мМ фосфатном буфере (pH 7,5) или 50 мкл суспензии хитозановых частиц, содержащей такое же количество эналаприлата (pH 7,5). Перед экспериментом у всех животных, а затем через шесть различных интервалов времени (от 5 до 300 мин) после закапывания собирали слезную жидкость у трех кроликов. Таким образом, в каждом отрезке времени были получены данные для 6 глаз. Слезную жидкость собирали с помощью круглых кусочков фильтровальной бумаги диаметром 5 мм, которые помещали в нижний конъюн-

ктивальный мешок на 5 мин, по 6 шт. на каждый глаз. Затем фильтры помещали в пробирки типа Eppendorf с 300 мкл 0,05 М фосфатного буфера (рН 7,5) на 30 мин для элюирования компонентов слезы. Элюаты центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин, супернатанты использовали для анализов. Содержание эналаприлата в элюатах определяли по его способности ингибировать активность АПФ, как описано выше.

Результаты и обсуждение

Получение и характеристика пустых хитозановых частиц

Для того, чтобы подобрать условия синтеза частиц на основе 5 кДа хитозана, мы варьировали рН среды, а также соотношение хитозана и сшивающего агента ТПФ при фиксированной концентрации хитозана 1 мг/мл. В процессе получения частиц при рН 6,0 часть хитозана выпадала в осадок, образовывалось несколько фракций частиц, чему соответствовало высокое значение индекса полидисперсности PDI. В более кислой среде (рН 5,0) удалось получить одну фракцию частиц со средним гидродинамическим диаметром около 100 нм (табл. 1). Оказалось, однако, что поверхностный заряд частиц чрезвычайно сильно зависит от соотношения хитозана и ТПФ. При высокой концентрации ТПФ ζ -потенциал частиц был практически равен нулю, что, вероятно, связано с большим числом сшивков между хитозаном и ТПФ и экранированием аминогрупп хитозана. Снижение концентрации ТПФ позволило получить частицы с более высоким значением ζ -потенциала (табл. 1). Таким образом, для получения однородных по размеру частиц с наиболее высоким ζ -потенциалом оптимальным было значение рН 5,0 и соотношение хитозана и ТПФ, равное 1:0,2.

Использованное нами производное хитозана (72 кДа гликоль-хитозан) гораздо лучше растворялось в нейтральной среде, поэтому нам удалось получить растворы гликоль-хитозана при рН 7,1, что удовлетворяет условиям потенциального применения в офтальмологии. Чтобы подобрать условия синтеза частиц на основе 72 кДа гликоль-хитозана, мы варьировали концентрацию хитозана, а также соотношение хитозана и ТПФ при фиксированном значении рН 7,1. Оказалось, что при концентрации гликоль-хитозана ниже 2 мг/мл образуются совершенно разнородные частицы с размером от нескольких нанометров до микрометра. При использовании концентрации хитозана 2 мг/мл мы наблюдали образование только одной фракции частиц. Варьирование соотношения хитозана и ТПФ показало, что при недостаточном количестве сшивающего агента образуются частицы с широким распределением по размеру и небольшим ζ -потенциалом. Повышение соотношения хитозана и ТПФ до 1:0,2 позволило получить частицы с узким распределением по размеру (табл. 2).

Исследования методом РЭМ показали, что полученные в выбранных нами условиях частицы на основе 5 кДа хитозана и 72 кДа гликоль-хитозана имели сферическую форму (рис. 1). Концентрация частиц на основе 5 кДа хитозана на подложке была заметно ниже, чем у частиц на основе гликоль-хитозана, поскольку для синтеза последних использовалась более высокая концентрация хитозана.

Размер 5 кДа хитозановых частиц, определенный методом РЭМ (рис. 1, А), варьировался от 50 до 160 нм и в среднем составил около 80 нм, что соответствует среднему гидродинамическому диаметру определенному методом ДСР (табл. 1). В случае гликоль-хитозана

Т а б л и ц а 1

Характеристики частиц, образованных 5 кДа хитозаном

Хитозан : ТПФ	рН 5,0			рН 6,0		
	<i>d</i> , нм	PDI	ζ , мВ	<i>d</i> , нм	PDI	ζ , мВ
1:0,25	80±10	0,26	+3±2	50±10	0,72	0±2
1:0,2	110±20	0,2	+23±2	660±200	0,9	+5±2
1:0,15	100±50	0,3	+20±2	35±10	0,95	+3±2

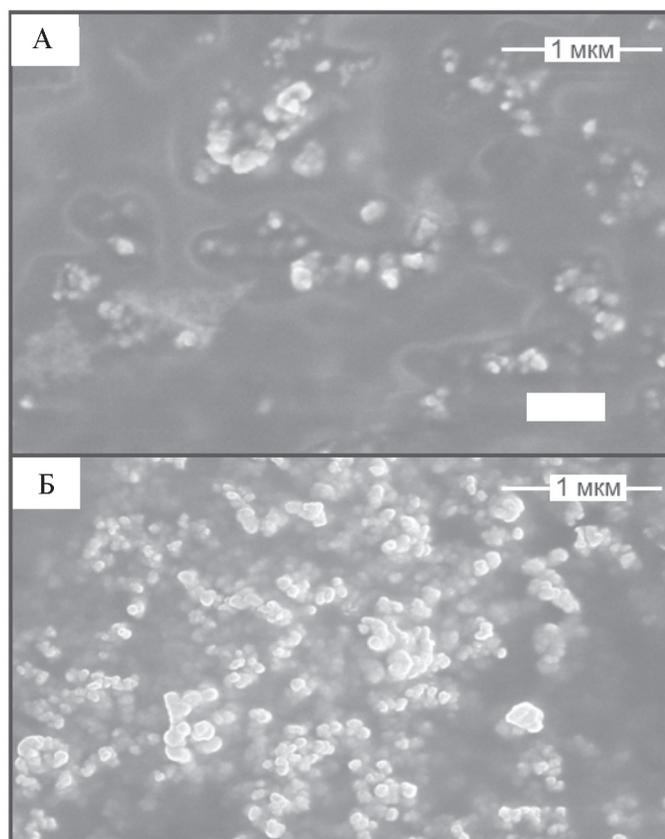


Рис. 1. РЭМ-изображения хитозановых частиц: А – 5 кДа хитозан, Б – 72 кДа гликоль-хитозан. Изображения получены при ускоряющем напряжении 30 кВ

размер частиц на снимках варьировался от 60 до 250 нм со средним значением 160 нм (рис. 1, Б), что меньше полученных методом ДСР значений среднего гидродинамического диаметра (табл. 1, 2). Возможно, частицы, образованные 72 кДа гликоль-хитозаном, частично разрушаются при высушивании на подложке.

Эффективность образования хитозановых частиц оценивали как соотношение доли хитозана в составе частиц к общему количеству внесенно-

го при синтезе хитозана. Оказалось, что $92\pm 5\%$ 5 кДа хитозана и $75\pm 7\%$ 72 кДа гликоль-хитозана находились в составе наночастиц.

Внедрение лекарственного препарата в хитозановые частицы

Включение эналаприлата в хитозановые наночастицы осуществлялось на стадии их получения. Эффективность включения эналаприлата в частицы на основе 5 кДа хитозана состави-

Т а б л и ц а 2

Характеристики частиц, образованных 72 кДа гликоль-хитозаном

Хитозан : ТПФ	pH 7,1		
	<i>d</i> , нм	PDI	ζ , мВ
1:0,2	250±10	0,19	+19±2
1:0,15	180±30	0,46	+11±2
1:0,1	40±30	0,8	+3±2

Т а б л и ц а 3

Сравнительные характеристики пустых хитозановых частиц и частиц, содержащих эналаприлат

Частицы	Вид хитозана	d , нм	PDI	ζ , мВ	Включение препарата, %
Пустые	5 кДа хитозан	110±20	0,2	+23±2	–
	72 кДа гликоль-хитозан	250±10	0,19	+19±2	–
Содержащие эналаприлат	5 кДа хитозан	105±20	0,16	+21±3	25±4
	72 кДа гликоль-хитозан	460±20	0,16	+10±2	41±3

ла около 25%, при этом наличие эналаприлата в частицах не привело к существенному изменению их характеристик (табл. 3).

Включение эналаприлата в частицы на основе 72 кДа гликоль-хитозана оказалось более эффективным (степень включения составила около 41%) и привело к значительному падению ζ -потенциала частиц, а также к увеличению их среднего гидродинамического диаметра (табл. 3).

Высвобождение эналаприлата

Одной из важнейших характеристик носителя является его способность высвобождать лекарственную субстанцию из частиц. Кинетика высвобождения эналаприлата была изучена *in vitro*

в физиологических условиях при 25 °С в 150 мМ NaCl (рН 7,5) в качестве модели слезы. Высвобождение эналаприлата из частиц происходило «со взрывом», за 15 мин инкубации из частиц на основе 5 кДа хитозана высвободилось около 43% включенного препарата, а из частиц на основе гликоль-хитозана – около 30% (рис. 2). Дальнейшее высвобождение эналаприлата происходило довольно медленно. Вероятно, сначала в раствор переходил эналаприлат, находящийся на поверхности частиц, а диффузия препарата из внутреннего объема частиц была затруднена. Дополнительного высвобождения препарата удалось добиться при смене буферного раствора, однако даже после трех смен физиологического

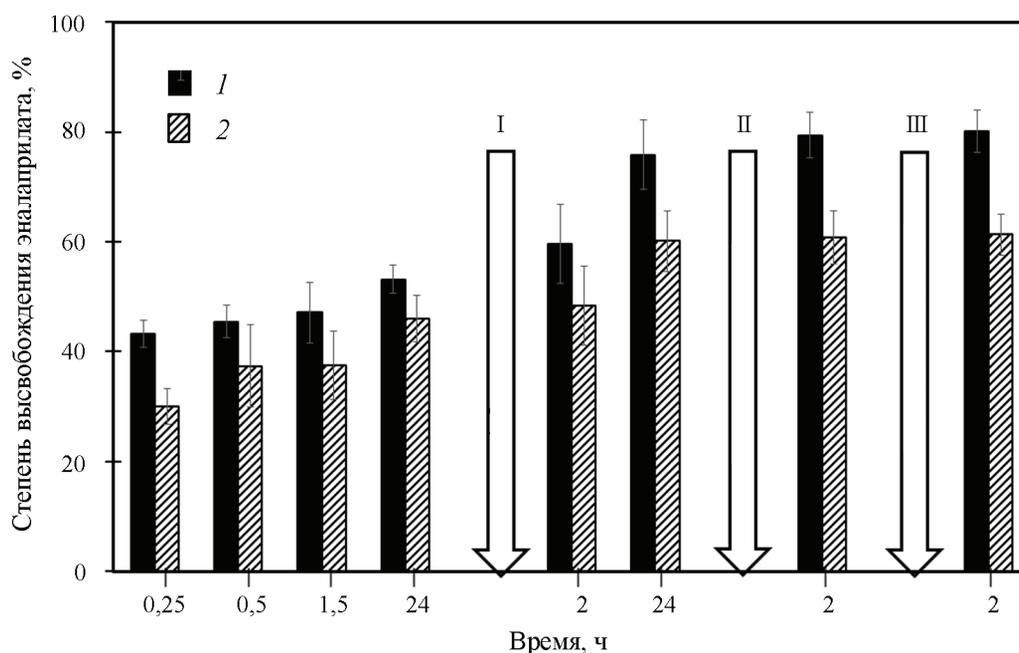


Рис. 2. Высвобождение эналаприлата из хитозановых частиц, образованных 5 кДа хитозаном (1) и 72 кДа гликоль-хитозаном (2). I – 1-я смена элюата, II – 2-я смена элюата, III – 3-я смена элюата

раствора только 80% препарата высвободилось из 5 кДа хитозановых частиц, тогда как из гликоль-хитозановых частиц высвободилось только 60% включенного эналаприлата. Такое удерживание препарата можно объяснить сильным электростатическим взаимодействием между отрицательно заряженными карбоксильными группами эналаприлата и положительно заряженными аминогруппами хитозана.

Для изучения механизма высвобождения эналаприлата из хитозановых наночастиц полученные данные были аппроксимированы с использованием различных математических моделей (табл. 4). 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.

Наблюдаемая схема высвобождения эналаприлата из хитозановых частиц *in vitro* лучше всего соответствует модели Корсмейера–Пеппаса по всем критериям (табл. 4). Эта модель указывает на диффузионно-контролируемое высвобождение препарата из разработанной наносистемы, где n – показатель степени диффузионного высвобождения, который можно использовать для характеристики разных механизмов высвобождения [$n \leq 0,45$ (фи-

ковская диффузия), $0,45 < n < 1$ (нефиковская диффузия)]. Значение n для хитозановых частиц соответствует фиковской диффузии, которая относится к процессу переноса препарата, при котором время релаксации полимера намного больше, чем характерное время диффузии растворителя. Уравнения первого порядка и Хигучи с меньшей точностью описывают процесс высвобождения эналаприлата из хитозановых частиц, что, вероятно, связано с диффузией растворителя во внутреннюю область частиц, которую упомянутые модели не учитывают. Модель Хиксона–Кроуэлла используется в предположении, что скорость высвобождения ограничена скоростью растворения частиц, а не диффузией препарата, что не наблюдается в нашей системе.

Эксперименты *in vivo*

В экспериментах *in vivo* на кроликах породы шиншилла мы сравнили временные профили содержания эналаприлата в слезной жидкости, определяемого по степени подавления активности АПФ в слезной жидкости кроликов после его инстилляции в составе частиц двух видов или в форме раствора. При использовании эналаприлата в форме водного раствора ингибиторная активность эналаприлата в слезе не определялась в слезе уже спустя 2 ч после закапывания. При этом эналаприлат в составе обоих видов хитозановых частиц дольше удерживался в слезе: через 2 ч активность снижалась до 20% от исходной, но определенный уровень ее сохранялся даже через 4 ч после инстилляции суспензии (рис. 3). Очевидно, что использование хитозановых частиц в качестве носителя эналаприлата позволило значительно увеличить время нахож-

Т а б л и ц а 4

Аппроксимация данных с использованием различных математических моделей высвобождения внедренного препарата [33]

Модель	Корсмейер–Пеппас			Хигучи		Первый порядок		Хиксон–Кроуэлл	
	Образец	K	n	R^2	K	R^2	K	R^2	K
5 кДа Хитозан	0,95	0,04	0,99	0,004	0,88	$1,54 \times 10^{-4}$	0,89	$1,95 \times 10^{-5}$	0,89
72 кДа Гликоль-хитозан	1,36	0,08	0,90	0,004	0,87	$2,1 \times 10^{-4}$	0,68	$2,83 \times 10^{-5}$	0,85

О б о з н а ч е н и я: K – константа скорости высвобождения, R^2 – коэффициент корреляции, n – показатель степени диффузионного высвобождения.

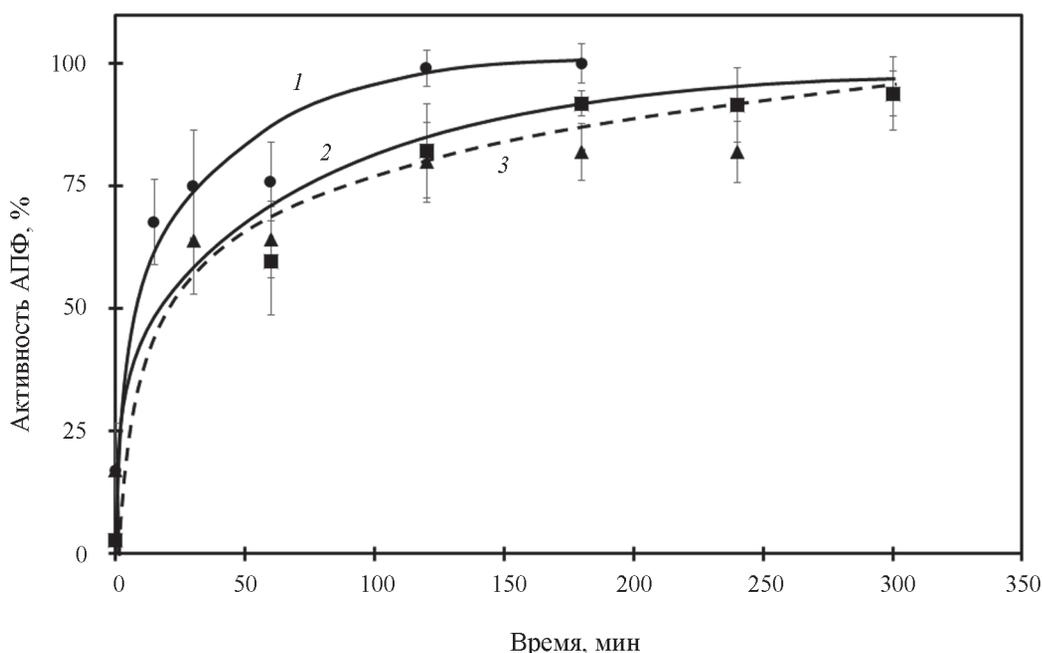


Рис. 3. Эффективность удерживания эналаприлата в слезной жидкости после однократной инстилляцией водного раствора препарата, а также в составе частиц на основе хитозанов (1 – эналаприлат в растворе, 2 – эналаприлат в 72 кДа гликоль-хитозановых частицах, 3 – эналаприлат в 5 кДа хитозановых частицах)

дения препарата в слезе. Известно, что поверхность глаза покрыта муциновым слоем, который обладает отрицательным зарядом из-за наличия в его составе сиаловых кислот. Увеличение времени нахождения эналаприлата в слезной жидкости обусловлено, вероятно, электростатическим притяжением между положительно заряженными протонированными аминогруппами хитозанов и отрицательно заряженными остатками сиаловых кислот на поверхности муцинов [14, 18].

Из вышесказанного следует, что хитозановые частицы могут длительное время удерживаться на поверхности глаза, способствуя тем самым пролонгированию «жизни» высвобождаемого препарата в слезе.

Таким образом, получены и охарактеризованы хитозановые частицы из двух видов хитозана – низкомолекулярного хитозана со средней молекулярной массой 5 кДа и гликоль-хитозана

со средней молекулярной массой 72 кДа, содержащие ингибитор АПФ эналаприлат, который снижает ВГД. Небольшой гидродинамический диаметр полученных частиц, положительное значение ζ -потенциала, достаточно высокая эффективность включения лекарственной субстанции и медленное ее высвобождение делают предложенные нами частицы перспективными носителями для доставки лекарственных средств в ткани глаза. Продемонстрировано, что внедрение эналаприлата в хитозановые частицы позволяет значительно продлить время удерживания препарата *in vivo* в слезе после однократной инстилляцией по сравнению с водным раствором. Таким образом, использование наночастиц на основе как низкомолекулярного 5 кДа хитозана, так и модифицированного 72 кДа гликоль-хитозана, перспективно для доставки лекарств в ткани глаза в целях снижения дозы вносимого препарата и частоты инстилляций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vaneev A., Tikhomirova V., Chesnokova N., Popova E., Beznos O., Kost O., Klyachko N. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22. N 22. 12368.
2. Gaudana R., Ananthula H. K., Parenky A., Mitra A.K. // *Ocular Drug Delivery.* 2010. Vol. 12. N 3. P. 348.
3. Achouri D., Alhanout K., Piccerelle P., Andrieu V. // *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2013. Vol. 39. N 11. P. 1599.
4. Agrahari V., Mandal A., Agrahari V., Trinh H.M., Joseph M., Ray A., Hadji H., Mitra R., Pal D., Mitra A.K. // *Drug Deliv. Transl. Res.* 2016. Vol. 6. N 6. P. 735.
5. Grassiri B., Zambito Y., Bernkop-Schnürch A. // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2021. Vol. 288. 102342.
6. Diebold Y., Calonge M. // *Prog. Retin. Eye Res.* 2010. Vol. 29. N 6. P. 596.

7. Lakhani P., Patil A., Majumdar S. // *Ther. Deliv.* 2018. Vol. 9. N 2. P. 137.
8. Srinivasarao D.A., Lohiya G., Katti D.S. // *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* 2019. Vol. 11. N 4. e1548.
9. Durak S., Rad M.E., Yetisgin A.A., Sutova H.E., Kutlu O., Cetinel S., Zarrabi A. // *Nanomaterials.* 2020. Vol. 10. N 6. 1191.
10. Hwang D., Ramsey J.D., Kabanov A.V. // *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2020. Vol. 156. P. 80.
11. Yadav M., Schiavone N., Guzman-Aranguéz A., Giansanti F., Papucci L., Perez de Lara M.J., Singh M., Kaur I.P. // *Drug Deliv. Transl. Res.* 2020. Vol. 10. N 4. P. 919.
12. Sogias I.A., Williams A.C., Khutoryanskiy V.V. // *Biomacromolecules.* 2008. Vol. 9. N 7. P. 1837.
13. Shahab M.S., Rizwanullah M., Alshehri S., Imam S.S. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. Vol. 163. P. 2392.
14. Muxika A., Etxabide A., Uranga J., Guerrero P., de la Caba K. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2017. Vol. 105. P. 1358.
15. Cazón P., Velazquez G., Ramírez J.A., Vázquez M. // *Food Hydrocoll.* 2017. Vol. 68. P. 136.
16. Naskar S., Sharma S., Kuotsu K. // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2019. Vol. 49. N 2019. P. 66.
17. Luo Q., Zhao J., Zhang X., Pan W. // *Int. J. Pharm.* 2011. Vol. 403. N 1–2. P. 185.
18. Ways T.M.M., Lau W.M., Khutoryanskiy V.V. // *Polymers (Basel).* 2018. Vol. 10. N 3. 267.
19. Shah G.B., Sharma S., Mehta A.A., Goyal R.K. // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2000. Vol. 36. N 2. P. 169.
20. Vaajanen A., Luhtala S., Oksala O., Vapaatalo H. // *Annals of Medicine.* 2008. Vol. 40. N 6. P. 418.
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. // *Рос. Офтальмол. Журн.* 2009. Т. 2. С. 42.
22. Agarwal R., Krasilnikova A.V., Raja I.S., Agarwal P., Ismail N.M. // *Eur. J. Pharmacol.* 2014. Vol. 730. N 2014. P. 8.
23. Grigoryev A.V., Beznos O.V., Binevski P.V., Pavlenko T.P., Struchkova S.V., Chesnokova N.B., Kost O.A. // *Angiotensin-Converting Enzyme Function and Role in Disease.* New York. 2020. Chapter 4. P. 91.
24. Holappa M., Vapaatalo H., Vaajanen A. // *Ann. Med.* 2020. Vol. 52. N 5. P. 191.
25. 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. Т. 128. № 3. С. 15.
26. 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.
27. Никольская И.И., Безнос О.В., Ельцов А.И., Гачок И.В., Чеснокова Н.Б. // *Вестн. Моск. Ун-та* 2018. Т. 59. № 2. С. 170.
28. Popova E.V., Tikhomirova V.E., Beznos O.V., Chesnokova N.B., Grigoriev Y.V., Klyachko N.L., Kost O.A. // *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2022. Vol. 40. 102493.
29. Hooper N.M., Turner A.J. // *Biochem. J.* 1987. Vol. 241. N 3. P. 625.
30. Kost O.A., Bovin N.V., Chemodanova E.E., Nasonov V.V., Orth T.A. // *J. Mol. Recognit.* 2000. Vol. 13. N 23. P. 360.
31. Svedas V.J., Galaev I.J., Borisov I.L., Berezin I.V. // *Anal. Biochem.* 1980. Vol. 101. N 1. P. 188.
32. Piquilloud Y., Reinhartz A., Roth M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1970. Vol. 206. N 1. P. 136.
33. Dash S., Murthy P.N., Nath L., Chowdhury P. // *Acta Pol. Pharm. – Drug Res.* 2010. Vol. 67. N 3. P. 217.

Информация об авторах

Попова Екатерина Васильевна – аспирант химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, popova.ekaterina1995@gmail.com;

Тихомирова Виктория Евгеньевна – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук, vetikhomirova@gmail.com;

Безнос Ольга Валерьевна – науч. сотр. ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, olval2011@mail.ru;

Чеснокова Наталья Борисовна – профессор ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, докт. биол. наук, nchesnokova2012@yandex.ru;

Григорьев Юрий Васильевич – руководитель центра коллективного пользования «Структурная диагностика материалов» ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова, канд. физ.-матем. наук, YGrigoriev@mail.ru;

Кост Ольга Алексеевна – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук, olga.a.kost@gmail.com.

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм

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.

Статья поступила в редакцию 05.09.2022;
одобрена после рецензирования 12.10.2022;
принята к публикации 14.10.2022.