

DOI: <https://doi.org/10.25276/2410-1257-2021-1-62-65>

## Ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента в составе кальций-фосфатных наночастиц как перспективные препараты для снижения внутриглазного давления

О.А. Лисовская<sup>1</sup>, О.В. Безнос<sup>1</sup>, В.Е. Тихомирова<sup>2</sup>, Т.А. Павленко<sup>1</sup>, О.А. Кост<sup>2</sup>, Н.Б. Чеснокова<sup>1</sup><sup>1</sup>ФГБУ «НМИЦ НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, Москва<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

### РЕФЕРАТ

**Цель.** Выяснить возможность применения ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (иАПФ) в составе кальций-фосфатных наночастиц (КФЧ) для снижения внутриглазного давления (ВГД).

**Материал и методы.** Получение кальций-фосфатных наночастиц, внедрение в них иАПФ, сравнительная оценка действия эналаприлата, лизиноприла и β-блокатора тимолола в составе КФЧ путем определения их влияния на внутриглазное давление у кроликов.

**Результаты.** Эналаприлат, лизиноприл и β-блокатор тимолол в составе КФЧ статистически более значимо снижают внутриглаз-

ное давление по сравнению с простыми растворами этих препаратов.

**Заключение.** Внедрение в КФЧ лекарственных препаратов, снижающих ВГД, увеличивает их биодоступность при инстилляционном способе введения, при этом сохраняется их биологическая активность, а эффективность терапевтического действия увеличивается. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования КФЧ для включения в них глазных гипотензивных лекарственных препаратов, применяемых в виде глазных капель.

**Ключевые слова:** кальций-фосфатные наночастицы, ингибитор ангиотензин-превращающего фермента, внутриглазное давление. ■

Точка зрения. Восток – Запад. 2021;1:62–65.

### ABSTRACT

#### Angiotensin-converting enzyme inhibitors included in calcium-phosphate nanoparticles as promising drugs for reducing intraocular pressure

О.А. Lisovskaya<sup>1</sup>, О.В. Beznos<sup>1</sup>, В.Е. Tikhomirova<sup>2</sup>, Т.А. Pavlenko<sup>1</sup>, О.А. Kost<sup>2</sup>, N.B. Chesnokova<sup>1</sup><sup>1</sup>Helmholtz Eye Institute, Moscow<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow

**Purpose.** To find out the possibility of using angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors included in calcium-phosphate nanoparticles (CFPs) to reduce intraocular pressure (IOP).

**Material and Methods.** Preparation of calcium-phosphate nanoparticles, introduction of ACEI in them, comparative evaluation of the action of enalaprilat, lisinopril and the beta-blocker timolol in the composition of CPF by determining their effect on intraocular pressure in rabbits.

**Results.** Enalaprilat, lisinopril and the beta-blocker timolol in the composition of CPF statistically more significantly reduce intraocular pressure compared to simple solutions of these drugs.

**Conclusion.** The introduction of drugs that reduce IOP into the CPF increases their bioavailability with the instillation method of administration, while their biological activity is preserved, and the effectiveness of the therapeutic effect increases. The results indicates the prospects of using CFPs to include ocular antihypertensive drugs used in the form of eye drops.

**Key words:** calcium-phosphate nanoparticles, angiotensin-converting enzyme inhibitor, intraocular pressure. ■

Point of View. East – West. 2021;1:62–65.

В терапии глаукомы актуален поиск эффективных препаратов, влияющих не только на снижение ВГД, но и улучшающих кровоток глаза и функционирование сетчатки. Согласно литературным данным, а также результатам наших исследований, ингибиторы ангиотензин-превращающего фер-

мента (иАПФ) могут значимо снижать ВГД, оказывать благоприятное воздействие на регионарный кровоток и гидродинамику глаза, а также функционирование нервных клеток сетчатки, то есть на основные звенья патогенеза глаукомы [1]. Стоит отметить, что доставка лекарственных веществ во внутренние структуры гла-

за сопряжена со многими трудностями. Подсчитано, что при инстилляциях только около 5-10% введенного лекарственного вещества проникает в переднюю камеру глаза. Это заставляет использовать препараты в высокой концентрации, что усиливает вероятность побочных эффектов и повышает стоимость лечения.

Использование нанотехнологий в значительной степени позволит решить многие проблемы доставки лекарственных препаратов в глаз. Преимуществами включения глазных лекарственных препаратов в наночастицы является увеличение биодоступности и пролонгация действия препарата. Это позволяет снизить дозу лекарственного препарата, частоту его введения и, следовательно, снизить как местные, так и общие побочные реакции. В офтальмологии особенно актуальна и перспективна разработка глазных лекарственных форм на основе нанотехнологий в связи с трудностью доставки лекарственных веществ в различные отделы глаза.

Современные нанотехнологии предлагают различные виды наночастиц для увеличения как биодоступности глазных лекарственных препаратов, так и времени пребывания их на поверхности глаза [2]. Наночастицы с внедренными лекарственными препаратами при инстилляциях в глаз могут лучше проникать через тканевые барьеры, а в некоторых случаях и продолжительное время оставаться на поверхности глаза в конъюнктиве или роговице и/или находиться в слезной пленке, постепенно высвобождая лекарственную субстанцию, тем самым пролонгируя действие препарата [3]. Лекарственные препараты в простых растворах проникают в ткани путем простой диффузии, скорость которой зависит от физико-химических свойств субстанции. Наночастицы проходят тканевые барьеры прежде всего за счет поступления в клетку путем эндоцитоза и последующего выхода из нее – экзоцитоза. Поглощенные вещества в клетке поступают в лизосомы, в которых они могут накапливаться или выводиться из них в переработанном виде [10].

К носителям, обладающим такими свойствами, относятся неорганические кальций-фосфатные наночастицы (КФЧ). Компоненты их – кальций и фосфат – присутствуют в организме, например, в составе костной ткани, поэтому они биосовместимы, неиммуногенны, не токсичны и биodeградируемы [5]. Задачей настоящей работы явилось включение в КФЧ-соединений, обладающих

способностью снижать ВГД, различной природы – ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента эналаприлата, лизиноприла и  $\beta$ -блокатора тимолола, а также характеристика полученных частиц и выяснение возможности усиления биологического действия выбранных препаратов при включении их в наночастицы.

## ЦЕЛЬ

Выяснить возможность применения ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (иАПФ) в составе кальций-фосфатных наночастиц (КФЧ) для снижения внутриглазного давления (ВГД).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

### Получение КФЧ

Кальций-фосфатные наночастицы были синтезированы по методике [11] из раствора  $K_2HPO_4$ , цитрата Na и  $CaCl_2$  в соотношении 5:1:5 с помощью ультразвукового гомогенизатора (Bandelin Sonopuls, Германия) [12]. Полученные частицы хранили при 4°C.

Включение эналаприлата в КФЧ производили на стадии получения частиц. Эналаприлат вносили в раствор  $K_2HPO_4$ . Конечная концентрация эналаприлата в растворе составила 7,7 мМ. Далее производили покрытие частиц 5 кДа хитозаном или гликоль-хитозаном по методике Kanwar [14]. Оценку эффективности включения лизиноприла в КФЧ проводили путем отделения частиц, содержащих включенные препараты, от раствора фильтрацией через мембраны Microcon 30 kDa и 100 kDa соответственно в процессе центрифугирования при 7000 g и определения лизиноприла в фильтратах.

Оценку эффективности внедрения эналаприлата в КФЧ проводили концентрированием путем фильтрации во время центрифугирования при 5400 g в течение 5 минут. Затем определяли активность эналаприлата в растворе, прошедшем через мембрану, с Cbz-Phe-His-Leu в качестве субстрата [15].

Концентрацию лизиноприла определяли по модифицированной

методике [15], основанной на реакции взаимодействия свободной аминогруппы ингибитора с ортофталевым альдегидом и N-ацетил-L-цистеином с образованием хромофорного соединения с максимумом поглощения при  $\lambda_{max}=340$  нм.

Для внедрения тимолола в КФЧ полученные частицы «покрывали» целлобиозой путем добавления к взвеси сконцентрированных частиц ее раствора («Merck», Германия) до 0,5%-го при медленном перемешивании.

Оптическую плотность хромофорных соединений определяли на фотометре для микропланшетов Tecan Infinite® M200 (Швейцария).

Эксперименты *in vivo* проводили на кроликах породы шиншилла массой 2-2,5 кг. Все эксперименты выполняли в соответствии с рекомендациями Association for research in Vision and Ophthalmology (ARVO) для проведения исследований на животных, а также с требованиями Комитета по этике НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца. Сравнительную оценку действия лизиноприла, эналаприлата и тимолола в составе КФЧ проводили путем определения их влияния на ВГД у кроликов.

В экспериментах с лизиноприлом, эналаприлатом и тимололом было задействовано 15 кроликов, которые были случайным образом разделены на 3 группы.

Первой и второй группе с лизиноприлом в оба глаза проводили однократное закапывание 40 мкл 1,5%-го раствора лизиноприла и 40 мкл суспензии 1,5%-го лизиноприла в КФЧ соответственно.

Первой и второй группе с эналаприлатом в оба глаза однократно закапывали 40 мкл 0,125%-го раствора эналаприлата и 40 мкл суспензии 0,125%-го эналаприлата в КФЧ (Rn230;360 нм) соответственно.

Первой и второй группе с тимололом в оба глаза однократно инстиллировали 40 мкл 0,5%-го водного раствора тимолола и 40 мкл суспензии 0,5%-го тимолола в КФЧ соответственно.

Третья группа (контрольная) получала инстилляцию в оба глаза 0,05 М фосфатного буферного раствора, pH=7,4. Предварительно было исследовано влияние пустых КФЧ на величину ВГД у интактных кроликов.

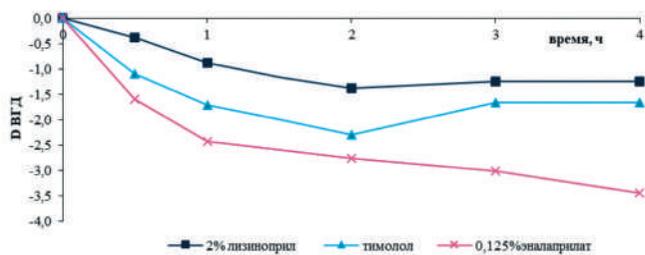


Рис. 1. Снижение ВГД у нормотензивных кроликов после однократной инстилляцией эналаприлата (0,125%-й), лизиноприла (2%-й), тимолола в растворе без КФЧ

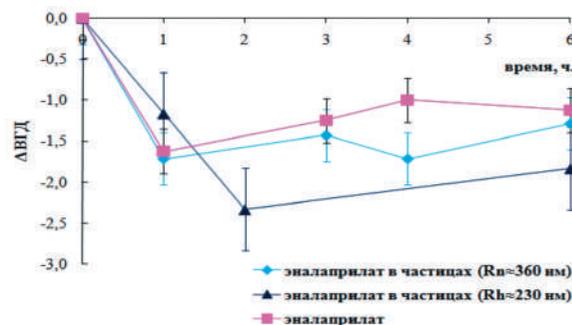


Рис. 2. Снижение ВГД у нормотензивных кроликов после однократной инстилляцией эналаприлата (0,125 %) в растворе и в КФЧ

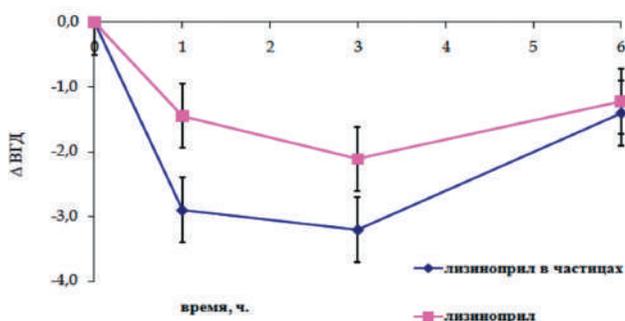


Рис. 3. Снижение ВГД после однократной инстилляцией 0,1%-го раствора лизиноприла и лизиноприла, включенного в КФЧ (мм рт. ст.)

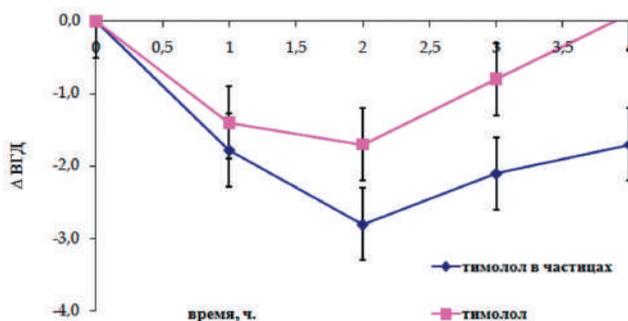


Рис. 4. Изменение ВГД у кроликов после однократной инстилляцией раствора тимолола (0,5%-й) и частиц с тимололом (Rh<140 нм)

ВГД измеряли до закапывания и далее в течение 6 часов с интервалом в 1 час с помощью автоматического тонометра для ветеринарии Topovet (Icare, Финляндия). В каждой временной точке оценивали снижение ВГД по сравнению с исходным в мм рт. ст. Эксперименты на одном кролике проводили с интервалом в 2 недели.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований наблюдалось достоверное снижение ВГД после инстилляцией иАПФ. По динамике изменения ВГД его сопоставимы со снижением его после инстилляцией тимолола. После внедрения иАПФ и тимолола в КФЧ обнаружена пролонгация воздействия препаратов на ВГД.

Исследованные суспензии КФЧ, содержащие эналаприлат (0,125%-й) и лизиноприл (2%-й), при многократных инстилляциях и при ежедневных 3-кратных инстилляциях в течение 5 дней не оказывали раз-

дражающего действия на конъюнктиву, не влияли на целостность эпителия роговицы и состояние оптических сред глаза. Также было показано, что суспензия пустых КФЧ не оказывала влияния на величину ВГД у нормотензивных кроликов. По нашим данным, как и по данным зарубежных исследователей [10], ни пустые КФЧ, ни нагруженные тимололом, не вызывали никаких побочных реакций в виде покраснения, отека, слезотечения и т.п.

Проведено сравнительное исследование влияния ингибиторов АПФ и тимолола без частиц на ВГД. Сравнение влияния инстилляций кроликам тимолола, лизиноприла (2%-й) и эналаприлата (0,125%-й) показало, что последний более значимо снижает ВГД, по сравнению с препаратами иАПФ (рис. 1).

Включение в КФЧ усиливало способность эналаприлата (0,125%-й) в растворе снижать ВГД у нормотензивных кроликов (рис. 2).

Сравнение влияния инстилляций кроликам 0,1%-го лизиноприла

и такового, внедренного в КФЧ, показало, что в составе наночастиц он статистически достоверно, т.е. более значимо, снижает ВГД (рис. 3).

В экспериментах по изучению влияния КФЧ, содержащих 0,5%-й тимолол, на ВГД здоровых кроликов, мы сравнили эффективность его инкапсулированного в КФЧ и аптечного препарата. Из рис. 4 видно, что внедренный в КФЧ тимолол (Rh<140 нм) проявляет более эффективное и пролонгированное действие по сравнению с его водным раствором.

Эналаприлат, лизиноприл и β-блокатор тимолол в составе наночастиц статистически более значимо снижали ВГД у нормотензивных кроликов, причем гипотензивный эффект был больше и продолжительнее, чем у этих препаратов в простом растворе. Таким образом, внедрение в КФЧ лекарственных препаратов увеличивает их биодоступность, при этом сохраняется их биологическая активность, а эффективность терапевтического действия увеличивается.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружено снижение ВГД после инстиляции ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента, сопоставимое с динамикой снижения офтальмотонуса после применения тимолола. Внедрение иАПФ и тимолола в состав кальций-фосфатных наночастиц вызывало более эффективное и пролонгированное снижение давления при отсутствии местнораздражающего воздействия. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования КФЧ для включения в них глазных лекарственных препаратов для снижения ВГД, применяемых в виде глазных капель.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ako-Adounvo A-M., Nagarwal R.C., Oliveira L. et al. Recent Patents on Ophthalmic Nanoformulations and Therapeutic Implications. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* 2014; 8(3):193–201. DOI: 10.2174/1872211308666140926112000.
2. Klyce S.D., Crosson C.E. Transport processes across the rabbit corneal epithelium: a review. *Curr. Eye Res.* 1985; 4: 323–331. DOI: 10.3109/02713688509025145.
3. Janagam D.R., Wu L., Lowe T.L. Nanoparticles for drug delivery to the

anterior segment of the eye. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017;122: 31–64. DOI: 10.1016/j.addr.2017.04.001.

4. Zhao R., Ren X., Xie C., Kong X. Towards understanding the distribution and tumor targeting of sericin regulated spherical calcium phosphate nanoparticles. *Microsc. Res. Tech.* 2017; 80(3): 321–330. DOI: 10.1002/jemt.22800.

5. Chu E., Chu T.C., Potter D.E. Mechanisms and sites of ocular action of 7-hydroxy-2-dipropylaminotetralin: A dopamine (3) receptor agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000; 293(3): 710–716.

6. Chen R., Qian Y., Li R., Zhang Q. et al. Methazolamide calcium phosphate nanoparticles in a ocular delivery system. *Yakugaku Zasshi.* 2010; 130(3):419–424. DOI: 10.1248/yakushi.130.419.

7. Hu J., Kovtun A., Tomaszewski A., Singer B.B. et al. A new tool for the transfection of corneal endothelial cells: Calcium phosphate nanoparticles. *Acta Biomater.* 2012; 8: 1156–1163. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.09.013.

8. Oh N., Park J-H. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int. J. Nanomed.* 2014; 9 (Suppl 1): 51–63. DOI: 10.2147/IJN.S26592.

9. Edelhauser H.F., Rowe-Rendleman C., Robinson M.R. et al. Ophthalmic drug delivery systems for the treatment of retinal diseases: Basic research to clinical applications. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010; 51(11): 5403–5420. DOI: 10.1167/iovs.10-5392.

10. Sokolova V., Kozlova D., Knuschke T. et al. Mechanism of the uptake of cationic and anionic calcium phosphate nanoparticles by cells. *Acta Biomater.* 2013; 9:7527–7535. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.02.034.

11. Olton D.Y., Close J.M., Sfeir C.S., Kumta P.N. Intracellular trafficking pathways

involved in the gene transfer of nanostructured calcium phosphate-DNA particles. *Biomaterials.* 2011; 32(30): 7662–7670. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.043.

12. Bell S., He Q., Chu T., Potter D. Intraocular Delivery Compositions and Methods Cross-Reference to Related Application. US Patent № WO 2004050065 (A1), prior. 2004-06

13. Шимановская Е.В., Безнос О.В., Клячко Н.Л. и др. Получение кальций-фосфатных наночастиц, содержащих тимолол, и оценка их влияния на внутриглазное давление в эксперименте. *Вестн. офтальмол.* 2012; 128(3): 15-18.

14. Костюк В., Потапович А., Ковалёва Ж. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. *Вопр. мед. хим.* 1990; 36: 88-91.

15. Нероев В.В., Давыдова Г.А., Перова Т.С. Моделирование иммуногенного увета у кроликов. *Бюлл. Экспер. Биол. Мед.* 2006; 142(11): 598-600.

16. Lowry O., Rozebrough N., Farr A., Randell R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.

17. Гулидова О.В., Любичкий О.Б., Клебанов Г.И., Чеснокова Н.Б. Изменение антиокислительной активности слезной жидкости при экспериментальной ожоговой болезни глаз. *Бюлл. экспер. биол. мед.* 1999; 128(11): 571-574.

18. Чеснокова Н.Б., Нероев В.В., Безнос О.В. и др. Окислительный стресс при увеите и его коррекция антиоксидантным ферментом супероксиддисмутазой (экспериментальное исследование). *Вестн. офтальмол.* 2014; 130(5): 30-36.



УФИМСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЛАЗНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

**Приглашаем врачей-офтальмологов на обучение в аспирантуре по специальности 31.06.01 – Клиническая медицина**



450008, г. Уфа, ул. Пушкина, 90 тел. +7 (347) 272-33-61 e-mail: obrotel@yandex.ru www.ufaeyeinstitute.ru