

Кальций-фосфатные наночастицы — система доставки лекарств в передний отдел глаза

О.В. Безнос¹В.Е. Тихомирова²Е.В. Попова²Т.А. Павленко¹О.А. Кост², Н.Б. Чеснокова¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
ул. Садовая-Черногрозская, 14/19, Москва, 105062, Российская Федерация

² ФГБУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
Ленинские горы, 1, Москва, 119991, Российская Федерация

РЕЗЮМЕ

Офтальмология. 2021;18(2):331–337

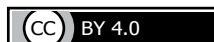
Цель: включение в кальций-фосфатные наночастицы соединений различной природы — низкомолекулярного ингибитора ангиотензин-превращающего фермента лизиноприла и высокомолекулярного фермента супероксиддисмутазы 1, характеристика полученных частиц и выяснение возможности усиления терапевтической эффективности выбранных препаратов при включении их в наночастицы. **Материалы и методы.** Для повышения стабильности полученных частиц был использован покрывающий агент β -D-целлобиоза. Определяли размеры и ζ -потенциал полученных частиц, оценивали эффективность включения препаратов. Сравнительную оценку биологического действия лизиноприла в растворе и лизиноприла в составе кальций-фосфатных частиц проводили путем определения их влияния на внутриглазное давление у 15 кроликов, разделенных на три группы. Сравнительную оценку биологического действия супероксиддисмутазы 1 в растворе и в составе кальций-фосфатных частиц проводили путем определения их влияния на течение экспериментального иммуногенного увеита у 10 кроликов и биохимические показатели (содержание белка и антиокислительная активность) во внутриглазной жидкости. **Результаты.** Кальций-фосфатные наночастицы, содержащие лизиноприл, характеризовались средним гидродинамическим радиусом в диапазоне 170–300 нм и ζ -потенциалом –17 мВ. Частицы, содержащие супероксиддисмутазу 1, характеризовались средним гидродинамическим радиусом в диапазоне 220–450 нм и ζ -потенциалом –4 мВ. Лизиноприл в составе наночастиц статистически достоверно более значительно снижал внутриглазное давление, чем лизиноприл в простом растворе. Супероксиддисмутазу 1 в составе наночастиц более эффективно снижала выраженность клинических проявлений увеита и нормализовала биохимические процессы во внутриглазной жидкости, чем тот же фермент в простом растворе. **Заключение.** Внедрение в кальций-фосфатные наночастицы лекарственных препаратов, как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных, увеличивает их биодоступность, при этом сохраняется их биологическая активность, а эффективность терапевтического действия увеличивается. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования кальций-фосфатных наночастиц для включения в них глазных лекарственных препаратов, применяемых в виде глазных капель.

Ключевые слова: кальций-фосфатные наночастицы, ингибитор ангиотензин-превращающего фермента, супероксиддисмутазы 1, внутриглазное давление, увеит

Для цитирования: Безнос О.В., Тихомирова В.Е., Попова Е.В., Павленко Т.А., Кост О.А., Чеснокова Н.Б. Кальций-фосфатные наночастицы — система доставки лекарств в передний отдел глаза. *Офтальмология*. 2021;18(2):331–337. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2021-2-331-337>

Прозрачность финансовой деятельности: Никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах

Конфликт интересов отсутствует



Calcium-Phosphate Nanoparticles — a System for Drug Delivery to the Anterior Eye Chamber

O.V. Beznos¹, V.E. Tikhomirova², E.V. Popova², T.A. Pavlenko¹, O.A. Kost², N.B. Chesnokova¹

¹ Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases
Sadovaya-Chernogryazskaya str., 14/19, Moscow, 105062, Russian Federation

² Lomonosov Moscow State University
Leninskie Gory, 1, Moscow, 119991, Russian Federation

ABSTRACT

Ophthalmology in Russia. 2021;18(2):331–337

Purpose: to prepare and characterize calcium-phosphate nanoparticles loaded with compounds of different nature: low-molecular inhibitor of angiotensin-converting enzyme lisinopril, and high-molecular enzyme superoxide dismutase 1. To estimate the possibility of enhancing the biological efficacy of these compounds via incorporation to the nanoparticles. **Material and methods.** To increase the stability of calcium-phosphate nanoparticles coating with β -D-cellobiose was used. The size, surface charge (ζ -potential) of the particles and efficacy of including of the selected compounds to the particles were measured. Comparative assessment of the efficacy of lisinopril solution and lisinopril in nanoparticles was made via the estimation of their ocular hypotensive effect in normotensive rabbits. To compare the efficacy of the superoxide dismutase 1 solution and superoxide dismutase 1 in nanoparticles the rabbit model of immunogenic uveitis was used. We estimated the clinical score for several signs of uveitis, protein level, and antioxidant activity in aqueous humor. **Results.** Calcium-phosphate nanoparticles containing lisinopril had average hydrodynamic radius of 170–300 nm and negative ζ -potential of -17 mV. Particles containing superoxide dismutase 1 had average hydrodynamic radius of 220–450 nm and negative ζ -potential of -4 mV. Lisinopril in nanoparticles caused a significantly greater decrease of intraocular pressure than lisinopril solution. Superoxide dismutase 1 in calcium-phosphate nanoparticles more efficiently decreased the clinical manifestations of uveitis and normalized the biochemical processes in aqueous humor than the enzyme in buffer solution. **Conclusion.** Incorporation of both low-molecular and high-molecular drugs to the calcium-phosphate nanoparticles enhance their bioavailability and therapeutic efficiency. The data obtained give evidence of the prospectively of the using of these nanoparticles as vehicles for the ophthalmic drugs used in eyedrops.

Keywords: calcium-phosphate nanoparticles, inhibitor of angiotensin-converting enzyme, superoxide dismutase 1, intraocular pressure, uveitis

For citation: Beznos O.V., Tikhomirova V.E., Popova E.V., Pavlenko T.A., Kost O.A., Chesnokova N.B. Calcium-Phosphate Nanoparticles — a System for Drug Delivery to the Anterior Eye Chamber. *Ophthalmology in Russia*. 2021;18(2):331–337. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2021-2-331-337>

Financial Disclosure: No author has a financial or property interest in any material or method mentioned
There is no conflict of interests

Наиболее распространенной глазной лекарственной формой для лечения заболеваний переднего отдела глаза являются глазные капли. Попадая на поверхность глаза, лекарственный препарат разбавляется слезой, вытекает из глаза при моргании. Часть препарата поступает в общий кровоток через сосуды конъюнктивы и носослезного канала. Так, например, показано, что около 50 % закапанного в глаз пилокарпина через конъюнктиву поступает в общий кровоток [1]. Для того чтобы препарат проник в переднюю камеру глаза, ему необходимо преодолеть тканевые барьеры. В результате во внутриглазную жидкость попадает только от 0,1 до 5 % от количества инстиллируемого препарата [2–4]. Например, концентрация тимолола в роговице, водянистой влаге и стекловидном теле составляет 0,4–4, 0,2–0,6 и 0,002–0,01 % соответственно от концентрации введенного препарата [5]. Следовательно, приходится увеличивать как концентрацию лекарственного препарата, так и частоту его закапывания, что, в свою очередь, повышает вероятность возникновения побочных эффектов не только местных, но и системных.

Основным барьером для проникновения лекарственных веществ через роговицу является плотно

упакованный многослойный эпителий [6]. Способность вещества проходить через эпителий роговицы зависит от размеров молекулы и физико-химических свойств, таких как гидрофобность и поверхностный заряд. Гидрофобные молекулы легче проникают через эпителий, но через строму роговицы лучше проходят гидрофильные. Через склеру и конъюнктиву могут проникать довольно крупные гидрофильные молекулы [7].

В связи с тем что во внутренние структуры глаза поступает лишь небольшое количество инстиллируемого в глаз препарата, встает вопрос о создании глазных лекарственных форм, облегчающих проникновение препаратов через тканевые барьеры.

Увеличить количество лекарственного вещества, поступающего во внутренние структуры глаза, можно путем удлинения времени его пребывания на поверхности глаза (использование гелей, мазей, полимерных пленок) и повышения его биодоступности. Современные нанотехнологии предлагают различные виды наночастиц для увеличения обоих этих параметров [8]. Наночастицы с внедренными лекарственными препаратами при инстилляциях в глаз могут лучше проникать через тканевые барьеры, а также в некоторых случаях

продолжительное время оставаться на поверхности глаза в конъюнктиве и/или роговице и в слезной пленке, постепенно высвобождая лекарственную субстанцию и тем самым пролонгируя действие препарата [9].

Важными условиями при выборе носителей для лекарственных препаратов являются отсутствие токсичности и биосовместимость. К носителям, обладающими такими свойствами, относятся неорганические кальций-фосфатные частицы (КФЧ). Компоненты КФЧ — кальций и фосфат присутствуют в организме, например, в составе костной ткани, поэтому они являются биосовместимыми, не иммуногенными, не токсичными и биодegradуруемыми [10].

Экспериментально доказано, что применение КФЧ в качестве носителей для препаратов, используемых в офтальмологии, повышает их эффективность. Так, например, E. Chu и соавт. показали, что включение в КФЧ агониста D2/D3 рецепторов к дофамину 7-гидрокси-2-дипропиламинотетралина усиливает его способность снижать внутриглазное давление (ВГД) у кроликов при инстилляциях в глаз [11]. R. Chen и соавт. выяснили, что включение в КФЧ другого гипотензивного препарата — ингибитора карбоангидразы метазоламида вдвое увеличивает продолжительность его действия [12].

Можно также использовать КФЧ для трансфекции генетического материала в клетки эндотелия роговицы [13]. Они могут применяться и для введения лекарственных препаратов и красителей в ткани заднего отрезка глаза [14].

Почему наночастицы увеличивают биодоступность лекарственных препаратов? Лекарственные препараты в простых растворах проникают в ткани путем простой диффузии, и скорость диффузии зависит от физико-химических свойств субстанции. Наночастицы проходят тканевые барьеры прежде всего за счет поступления в клетку путем эндоцитоза и последующего выхода из нее — за счет экзоцитоза [15].

Основные пути эндоцитоза — это клатрин- и кавеолин-зависимый эндоцитоз, фагоцитоз, макропиноцитоз и пиноцитоз. Клатрин- и кавеолин-зависимый эндоцитоз опосредуется рецепторами и осуществляется с помощью мембранных белков — клатрина или кавеолина и обеспечивает проникновение в клетку частиц небольших размеров — в основном до 100 нм. К фагоцитозу способны специализированные клетки — фагоциты, поглощающие более крупные частицы. Пиноцитоз осуществляется за счет выпячивания клеточной мембраны и образования везикул, окружающих поглощаемый материал и переносящих его внутрь клетки. Поглощенные вещества в клетке поступают в лизосомы, в которых они могут накапливаться или выводиться из них в переработанном виде. Сведений о механизмах эндоцитоза КФЧ очень мало. Однако есть данные о том, что в эндоцитозе КФЧ может принимать участие макропиноцитоз [16], а также клатрин- и кавеолин-зависимый эндоцитоз [17].

Целью настоящей работы явилось изучение возможности включения в кальций-фосфатные наночастицы соединений различной природы — низкомолекулярного ингибитора ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) лизиноприла и высокомолекулярного фермента супероксиддисмутазы 1 (СОД1), характеристика полученных частиц и выяснение возможности усиления биологического действия выбранных препаратов при включении их в наночастицы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение КФЧ

Для получения КФЧ применяли методику, предложенную в 2004 году [18] и модифицированную нами [19].

Для повышения стабильности частиц был использован покрывающий агент — β -D-целлобиоза. Включение лизиноприла (Sigma, США) и рекомбинантной СОД1 человека (Рексод-ОФ, ООО НПП «Ферментные технологии», Россия) проводили непосредственно на стадии получения КФЧ. Полученные частицы хранили при +4 °C.

Определение размеров, ζ -потенциала и поверхностного заряда полученных КФЧ выполняли с помощью многофункционального прибора ZetasizerNanoZS (MalvernInstrument, Великобритания).

Оценку эффективности включения лизиноприла и СОД1 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 и СОД1 в филтрате.

Концентрацию лизиноприла определяли по модифицированной методике [20], 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. Оптическую плотность хромофорного соединения определяли с помощью фотометра для микропланшетов Tecan Infinite® M200 (Швейцария).

Определение активности СОД проводили методом, основанным на торможении СОД реакции автоокисления кверцетина. За единицу активности принимают такое количество фермента, которое в течение 20 мин. вызывает ингибирование реакции окисления кверцетина на 50 % при pH 10,2 и температуре 25 °C [21].

Эксперименты *in vivo* проводили на кроликах породы шиншилла массой 2–2,5 кг. Все эксперименты выполнены в соответствии с рекомендациями Association for research in Vision and Ophthalmology (ARVO) для проведения исследований на животных, а также в соответствии с требованиями Комитета по этике НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца.

Для сравнения эффективности лизиноприла в растворе и лизиноприла в составе КФЧ оценивали их влияние на внутриглазное давление (ВГД) у нормотензивных кроликов.

Оценка влияния лизиноприла 1 % и лизиноприла, введенного в КФЧ, на ВГД у кроликов

В эксперименте было задействовано 15 кроликов, которые были случайным образом разделены на 3 группы. Первой и второй группе в оба глаза однократно закапывали 40 мкл 1,5 % раствора лизиноприла в 0,05М фосфатном буферном растворе pH 7,4 и 40 мкл суспензии 1,5 % лизиноприла в КФЧ соответственно. Третья группа — контрольная — получала инстилляцию в оба глаза 0,05М фосфатного буферного раствора pH 7,4. Предварительно было исследовано влияние пустых КФЧ на величину ВГД у интактных кроликов.

У кроликов измеряли ВГД до закапывания и далее в течение 6 ч с интервалом в 1 час с помощью автоматического тонометра для ветеринарии Tonovet (Icare, Финляндия). В каждой временной точке оценивали снижение ВГД по сравнению с исходным в мм рт. ст.

Сравнительную оценку действия СОД1 в растворе и СОД1 в составе КФЧ проводили путем оценки их влияния на течение экспериментального иммуногенного увеита у кроликов и на биохимические показатели в водянистой влаге.

Моделирование экспериментального иммуногенного увеита у кроликов

В эксперименте было задействовано 15 кроликов породы шиншилла массой 2–2,5 кг. У 10 животных воспроизводили иммуногенный увеит по известной методике [22]. Для этого животным вводили стерильную нормальную лошадиную сыворотку подкожно в количестве 5 мл, затем на 10-е сутки в оба глаза интравитреально вводили разрешающую дозу сыворотки в количестве 70 мкл под местной анестезией Алкаином (Проксиметакаин 0,5 %, Alcon, Бельгия). Пять кроликов оставались интактными.

Клиническую картину оценивали ежедневно с 1-х по 10-е сутки после введения разрешающей дозы лошадиной сыворотки путем биомикроскопии с помощью щелевой лампы. В условных баллах оценивали выраженность следующих признаков: отек и гиперемия век, булбарной конъюнктивы и радужки, отек роговицы, вид экссудата и количество фибрина в передней камере глаза, наличие задних синехий, помутнение хрусталика, интенсивность неоваскуляризации роговицы. За 0 баллов принимали отсутствие признака, 1 — слабо выраженный, 2 — выраженный, 3 — ярко выраженный признак.

Все животные с увеитом (10 кроликов, 20 глаз) были случайным образом разделены на 2 опытные группы:

I группа (5 кроликов, 10 глаз) получала инстилляцию раствора СОД1 (1 мг/мл) с активностью 200 kU/мг в 0,15М NaCl (pH 6,5) 3 раза в день по 30 мкл в оба глаза;

II группа (5 кроликов, 10 глаз) получала инстилляцию суспензии СОД1, содержащей КФЧ с активностью 200 kU/мг в 0,15М NaCl (pH 6,5) в том же режиме.

Для оценки нормальных значений исследуемых параметров использовали группу из 5 здоровых животных (10 глаз).

Лечение проводили в течение 7 дней, начиная со дня введения разрешающей дозы.

На 8-е сутки у всех животных, включая здоровых, отбирали водянистую влагу путем парацентеза инсулиновым шприцем под местной анестезией Алкаином (Проксиметакаин 0,5 %, Alcon, Бельгия) и центрифугировали 10 мин. при 3000 об/мин. В супернатанте определяли содержание общего белка по Лоури [23] и антиокислительную активность (АОА) по параметрам кинетики хемилюминесценции в модельной системе Нб-Н₂O₂-люминол [24], используя Тролокс в качестве стандарта. Кинетику хемилюминесценции регистрировали с помощью хемилюминометра «Биотокс-7» (АНО «Инженерный Центр — Экология», Москва).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистических пакетов программ Excel и Statistica 10.0. Достоверность различий между группами с уровнем значимости не менее 95 % оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна — Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами были получены КФЧ, содержащие ингибитор ангиотензин-превращающего фермента лизиноприл (молекулярная масса 405 Да) и фермент СОД1 (молекулярная масса 32,5 кДа). КФЧ, содержащие лизиноприл, характеризовались средним гидродинамическим радиусом в диапазоне 170–300 нм и ζ-потенциалом –17 мВ. КФЧ, содержащие СОД1, характеризовались средним гидродинамическим радиусом в диапазоне 220–450 нм и ζ-потенциалом –4 мВ. Степень включения лизиноприла в КФЧ составляла 15–30 %, а СОД1 около 50 %. Таким образом, КФЧ способны включать как высоко-, так и низкомолекулярные препараты.

Установлено, что при хранении КФЧ, покрытых целлобиозой и содержащих лизиноприл или СОД1, при температуре +4 °С при добавлении азида натрия или бензалкония хлорида в качестве антисептика по крайней мере в течение 2 месяцев не происходит изменения их характеристик (величины среднего гидродинамического радиуса и ζ-потенциала). Этот результат является очень важным при рассмотрении перспективности использования таких частиц в качестве основы для фармацевтического препарата.

Кроме того, следует отметить, что выявлен эффект стабилизации СОД1 при хранении в составе частиц по сравнению с водным раствором этого белка, что также имеет практическое значение.

Для того чтобы выяснить, как влияет включение глазных лекарственных препаратов в КФЧ на проникновение их во внутренние структуры глаза и терапевтическую эффективность, было изучено влияние включения низкомолекулярного соединения — иАПФ лизиноприла и высокомолекулярного соединения фермента СОД1 на процессы, протекающие во внутренних структурах глаза. Сравнили гипотензивное действие лизиноприла

с действием лизиноприла, включенного в КФЧ, на нормотензивных кроликах, а на модели острого увеита у кроликов оценивали противовоспалительное действие СОД1 и СОД1 в КФЧ.

Однократные и многократные инстилляций растворов пустых КФЧ и суспензии частиц с внедренным в них лизиноприлом или СОД1 не оказывали местно раздражающего действия. Также было показано, что инстилляцией суспензии пустых КФЧ не вызвала изменений ВГД у нормотензивных кроликов.

Сравнение влияния инстилляций у кроликов раствора лизиноприла и лизиноприла, внедренного в КФЧ, показало, что в составе наночастиц лизиноприл статистически достоверно более значимо снижает ВГД (рис. 1).

Этот эффект можно объяснить лучшим проникновением лизиноприла в составе наночастиц в переднюю камеру глаза. Таким образом, внедрение ингибитора АПФ в КФЧ позволяет увеличить биодоступность его при инстилляционном введении.

Сравнительное изучение влияния СОД1 и СОД1 в составе КФЧ на течение воспалительного процесса во внутренних структурах глаза на модели иммунного увеита у кроликов показало, что инстилляцией СОД1 в составе КФЧ более эффективно снижают выраженность клинических проявлений увеита и нормализуют биохимические процессы во внутриглазной жидкости. Отек радужки и поступление фибрина в переднюю камеру глаза были статистически достоверно менее выражены при лечении СОД1 в составе КФЧ, чем при лечении раствором СОД1 ($p < 0,05$). При этом при использовании СОД1 в составе КФЧ концентрация белка в водянистой влаге была достоверно ниже (рис. 2).

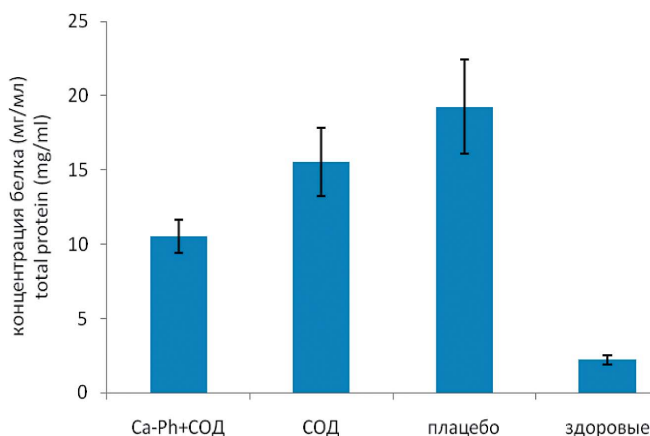


Рис. 2. Концентрация общего белка в водянистой влаге кроликов на 8-е сутки острого увеита ($M \pm m$, мг/мл)

Fig. 2. Total protein concentration in aqueous humor of rabbits on the 8 day of acute experimental uveitis ($M \pm SEM$, mg/ml). Bars: CaPh nanoparticles with SOD, SOD, placebo, healthy controls

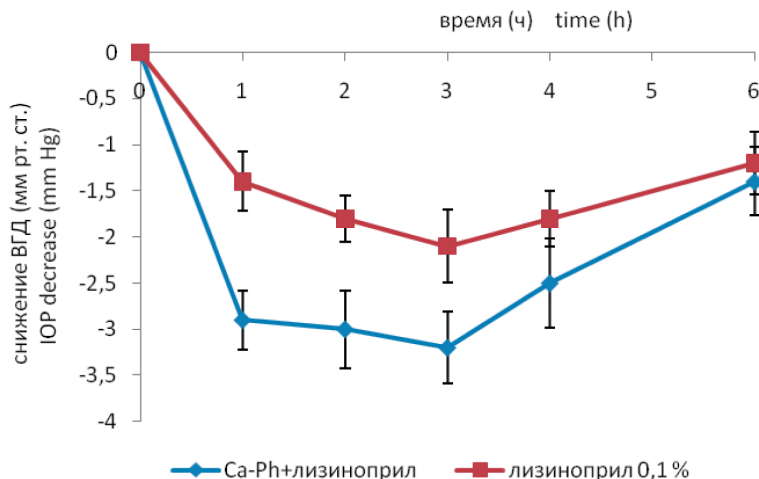


Рис. 1. Снижение ВГД после однократной инстилляцией 0,1 % раствора лизиноприла и лизиноприла, включенного в КФЧ ($M \pm m$, мм рт. ст.)

Fig. 1. Mean decrease of intraocular pressure after single instillation of 0.1 % lisinopril and Ca-Ph particles containing lisinopril ($M \pm SEM$, mm Hg)

Это свидетельствует о том, что фермент в составе КФЧ более эффективно снижает проницаемость гематоофтальмического барьера, которая значительно увеличивается при увеите.

При увеите во внутриглазной жидкости существенно снижается АОА, что свидетельствует о возросшем потреблении антиоксидантов на связывание образовавшихся при воспалении в большом количестве свободных радикалов [25]. Под влиянием СОД1 в КФЧ АОА сохраняется на более высоком уровне, чем под влиянием простого раствора фермента (рис. 3).

Исходя из полученных результатов сравнительного исследования влияния инстилляций простого раствора СОД1 и раствора СОД1, внедренной в КФЧ, на течение воспалительного процесса во внутренних структурах

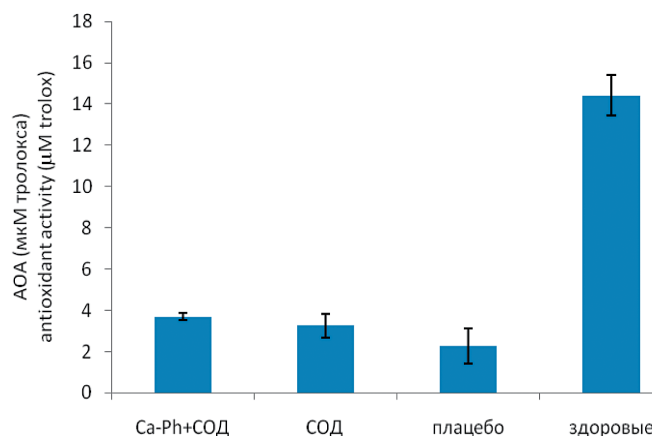


Рис. 3. Антиокислительная активность в водянистой влаге кроликов на 8-е сутки острого увеита ($M \pm m$, мкМ тролокса)

Fig. 3. Antioxidant activity in aqueous humor of rabbits on the 8 day of acute experimental uveitis ($M \pm SEM$, mM trolox). Bars: CaPh nanoparticles with SOD, SOD, placebo, healthy controls

глаза (uveита), можно заключить, что СОД1, внедренная в КФЧ, оказывает более сильное противовоспалительное действие по сравнению с простым раствором фермента. Это свидетельствует о том, в составе КФЧ СОД лучше проходит тканевые барьеры и в большей концентрации поступает во внутренние структуры глаза.

ВЫВОДЫ

Таким образом, внедрение в КФЧ лекарственных препаратов как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных, увеличивает их биодоступность, при этом сохраняется их биологическая активность, а эффективность

терапевтического действия увеличивается. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования кальций-фосфатных наночастиц для включения в них глазных лекарственных препаратов, применяемых в виде глазных капель.

УЧАСТИЕ АВТОРОВ:

Безнос О.В. — исследования *in vivo*, оформление библиографии, подготовка иллюстраций;
Тихомирова В.Е. — исследования *in vitro*, написание текста;
Попова Е.В. — исследования *in vitro*, написание текста;
Павленко Т.А. — исследования *in vivo*, техническое редактирование;
Кост О.А. — научное редактирование;
Чеснокова Н.Б. — написание текста.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Urtti A. Systemic absorption of ocular pilocarpine is modified by polymer matrices. *Int. J. Pharm.* 1985;23:147–161.
- Lee V.H.L., Robinson J.R. Review: Topical ocular drug delivery: Recent developments and future challenges. *J. Ocul. Pharmacol.* 1986;2:67–108. DOI: 10.1089/jop.1986.2.67
- Prausnitz M.R., Noonan J.S. Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: a literature analysis for drug delivery to the eye. *J. Pharm. Sci.* 1998;87(12):1479–1488. DOI: 10.1021/js9802594
- Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006;58:1131–1135. DOI: 10.1016/j.addr.2006.07.027
- Subrizi A., Del Amo E.M., 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;24(8):1446–1457. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.02.001
- 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
- Ahmed I., Patton T.F. Importance of the noncorneal absorption route in topical ophthalmic drug delivery. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1985;26:584–587.
- Ako-Adounvo A.-M., Nagarwal R.C., Oliveira L., Boddu S.H., Wang X.S., Dey S., Karla P.K. Recent Patents on Ophthalmic Nanoformulations and Therapeutic Implications. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* 2014;8(3):193–201. DOI: 10.2174/1872211308666140926112000
- 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
- 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
- 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.
- Chen R., Qian Y., Li R., Zhang Q., Liu D., Wang M., Xu Q. Methazolamide calcium phosphate nanoparticles in a ocular delivery system. *Yakugaku Zasshi.* 2010;130(3):419–424. DOI: 10.1248/yakushi.130.419
- Hu J., Kovtun A., Tomaszewski A., Singer B.B., Seitz B., Eppe M., Steuhl K.P., Ergün S., Fuchsluger T.A. 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
- Edelhauser H.F., Rowe-Rendleman C., Robinson M.R., Dawson D.G., Chader G.J., Grossniklaus H.E., Rittenhouse K.D., Wilson C.G., Weber D.A., Kuppermann B.D., Csaky K.G., Olsen T.W., Kompella U.B., Holers V.M., Hageman G.S., Gilger B.C., Campochiaro P.A., Whitcup S.M., Wong W.T. 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/iov.10-5392
- 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
- Sokolova V., Kozlova D., Knuschke T., Buer J., Westendorf A.M., Eppe M. 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
- Olton D.Y., Close J.M., Sfeir C.S., Kumta P.N. Intracellular trafficking pathways involved in the gene transfer of nano-structured calcium phosphate-DNA particles. *Biomaterials.* 2011;32(30):7662–7670. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.043
- Bell S., He Q., Chu T., Potter D. Intraocular Delivery Compositions and Methods Cross-Reference to Related Application. US Patent № WO 2004050065 (A1), prior. 2004-06-17.
- 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;128(3):15–18. [Shimanovskaya E.V., Beznos O.V., Klichko N.L., Kost O.A., Nikol'skaia I.I., Pavlenko T.A., Chesnokova N.B., Kabanov A.V. Production of timolol containing calcium-phosphate nanoparticles and evaluation of their effect on intraocular pressure in experiment. *Annales of Ophthalmology = Vestnik Oftalmologii* 2012;128(3):15–18 (In Russ.).]
- Svedas V., Galaev I., Borisov I., Berezin I. The interaction of amino acids with o-phthalaldehyde: a kinetic study and spectrophotometric assay of the reaction product. *Anal. Biochem.* 1980;101:188–195.
- Костюк В., Потапович А., Ковалёва Ж. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. *Вопросы медицинской химии.* 1990;36:88–91. [Kostiuk V.A., Potapovich A.I., Kovalyova J.V. A simple and sensitive method of superoxide dismutase activity based on quercetin oxidation. *Medical chemistry affairs = Voprosy medicinskoy khimi.* 1990;2:88–91 (In Russ.).]
- Neroev V.V., Davydova G.A., Perova T.S. Model of experimental uveitis in rabbits *Bull. Exper Biol Med.* 2006;142(11):598–600. DOI: 10.1007/s10517-006-0440-5
- Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193:265–275.
- Gulidova O.V., Lubitsky O.B., Klebanov G.I., Chesnokova N.B. Antioxidant activity in tear fluid in experimental alkali eye burns. *Bull. Exper Biol Med.* 1999;128(11):571–574. DOI: 10.1007/bf02433426
- Чеснокова Н.Б., Нероев В.В., Безнос О.В., Бейшенова Г.А., Никольская И.И., Кост О.А., Бинеvский П.В., Шехтер А.Б. Окислительный стресс при увеите и его коррекция антиоксидантным ферментом супероксиддисмутазой (экспериментальное исследование). *Вестник офтальмологии.* 2014;130(5):30–36. [Chesnokova N.B., Neroev V.V., Beznos O.V., Beishenova G.A., Nikol'skaia I.I., Kost O.A., Binevskii P.V., Shekhter A.B. Oxidative stress in uveitis and its correction with superoxide dismutase antioxidative enzyme (experimental study). *Annales of Ophthalmology = Vestnik Oftalmologii.* 2014;130(5):30–34 (In Russ.).]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца»
 Безнос Ольга Валерьевна
 научный сотрудник
 ул. Садовая-Черногызская, 14/19, Москва, 105062, Российская Федерация
<https://orcid.org/0000-0001-7557-4955>

ФГБУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
 Тихомирова Виктория Евгеньевна
 научный сотрудник
 Ленинские горы, 1, Москва, 119991, Российская Федерация
<https://orcid.org/0000-0003-4368-3430>

ФГБУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
 Попова Екатерина Васильевна
 аспирант
 Ленинские горы, 1, Москва, 119991, Российская Федерация

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца»
 Павленко Татьяна Аркадьевна
 кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник
 ул. Садовая-Черногызская, 14/19, Москва, 105062, Российская Федерация
<https://orcid.org/0000-0001-8032-4248>

ФГБУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
 Кост Ольга Алексеевна
 кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник
 Ленинские горы, 1, Москва, 119991, Российская Федерация

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца»
 Чеснокова Наталья Борисовна
 доктор биологических наук, профессор, начальник отдела патофизиологии и биохимии
 ул. Садовая-Черногызская, 14/19, Москва, 105062, Российская Федерация
<https://orcid.org/0000-0002-7856-8005>

ABOUT THE AUTHORS

Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases
 Beznos Olga V.
 research officer
 Sadovaya-Chernogryazskaya str., 14/19, Moscow, 105062, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0001-7557-4955>

Lomonosov Moscow State University
 Tikhomirova Victoria E.
 research officer
 Leninskie Gory, 1, Moscow, 119991, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0003-4368-3430>

Lomonosov Moscow State University
 Popova Ekaterina V.
 postgraduate
 Leninskie Gory, 1, Moscow, 119991, Russian Federation

Helmholtz National Medical Research Center of Eye Disease
 Pavlenko Tatyana. A.
 PhD, senior research officer
 Sadovaya-Chernogryazskaya str., 14/19, Moscow, 105062, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0001-8032-4248>

Lomonosov Moscow State University
 Kost Olga A.
 PhD, leading research officer
 Leninskie Gory, 1, Moscow, 119991, Russian Federation

Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases
 Chesnokova Natalya B.
 Dr. of Biol. Sci., Professor, head of the Department of patophysiology and biochemistry of the eye
 Sadovaya-Chernogryazskaya str., 14/19, Moscow, 105062, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0002-7856-8005>