

Н. Л. Еремеев¹, В. Н. Ермакова², О. А. Кост¹,
И. И. Никольская¹, П. А. Цайтлер¹

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СУСПЕНЗИИ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ГЕЛЯ КАК ПРОЛОНГАТОРА ДЕЙСТВИЯ ГЛАЗНЫХ КАПЕЛЬ ПРОКСОДОЛОЛА

¹ Химический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова;

² Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва

Предложена новая лекарственная форма офтальмологических препаратов. Эффективно включая в себя раствор физиологически активного вещества при комнатной температуре, суспензия термочувствительного поли-N-изопропилакриламидного (поли-НИПАА) геля формирует на поверхности глаза тонкую пленку и постепенно выделяет лекарственное средство. Проксодолол в виде суспензии поли-НИПАА геля демонстрирует больший физиологический эффект по сравнению с традиционной капельной формой. Сама по себе суспензия поли-НИПАА геля не оказывает влияния на внутриглазное давление у кроликов, но приводит к существенной пролонгации действия лекарственного препарата.

Одним из недостатков водных растворов глазных капель является ограниченное время контакта лекарственного средства с роговицей и конъюнктивой глазного яблока, так как более 80 % его быстро смывается слезой [1]. В этой связи при лечении глазных болезней зачастую требуется либо повышение концентрации препарата, либо увеличение частоты закапываний, что ухудшает качество жизни больного.

Для пролонгации эффекта глазных капель широко используется способ повышения вязкости растворителя путем введения в состав композиции полимеров [2, 3]. Другой подход состоит в использовании нерастворимых полимерных пленок, содержащих активный компонент [4 – 7]. Предлагаемый нами метод — использование суспензии геля на основе термочувствительных полимеров в качестве носителя лекарственного средства — является комбинацией этих двух способов.

Термочувствительные полимеры в водных растворах характеризуются наличием так называемой нижней критической температуры растворения (НКТР) [8]. НКТР является критической температурой, при которой полимер претерпевает обратимый фазовый переход, сопровождающийся изменением гидрофильно-гидрофобного баланса полимерных цепей — ниже НКТР полимер гидрофилен (растворим в воде), в то время как выше НКТР — гидрофобен (и в воде нерастворим) [9]. Таким образом, при температурах ниже НКТР термочувствительный полимер образует в воде истинный раствор, повышение температуры до НКТР и выше приводит к расслоению раствора на две фазы — водную и полимерную. Для гелей, синтезированных на основе термополимеров, фазовый переход (помимо изменения гидрофильно-гидрофобного баланса полимерных цепей) выражается в резком уменьшении объема препарата при нагревании выше НКТР [8].

Среди большого числа термочувствительных полимеров особый интерес для различных биомедицинских применений вызывает поли-N-изопропилакриламид (поли-НИПАА) [10, 11]. Это связано с тем, что НКТР поли-НИПАА равна 32 °С [12], то есть находится в интервале между значениями комнатной температуры (20 °С) и температуры тела (37 °С). Фазовый переход полимера и

гидрофобный характер поверхности глазного яблока приводит к тому, что истинный водный раствор поли-НИПАА образует тонкую пленку при нанесении его на глаз [13]. Таким образом, можно ожидать, что: 1) суспензия термочувствительного поли-НИПАА геля будет относительно хорошо сорбироваться на поверхности глаза; 2) раствор лекарственного препарата, предварительно включенного в гель, будет относительно долго находиться в контакте с роговицей.

Настоящая работа проведена с целью подбора *in vitro* оптимального состава термогеля в качестве основы для проксодолола (гибридного $\beta_{1,2}$ - α_1 -адреноблокатора) и изучения влияния полученного средства на внутриглазное давление (ВГД) интактных глаз кроликов в сравнении с водным раствором проксодолола.

Материалы и методы

В работе использовали: N-изопропилакриламид (НИПАА), флуоресцеин и акрилоил-флуоресцеин производства Sigma (США), персульфат аммония, N,N'-метил-бисакриламид (МБА) и N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) производства Reanal (Венгрия), субстанция проксодолола производства отдела промышленной технологии ЦХЛС ВНИХФИ (Россия), соли и компоненты буферных растворов марки х.ч. производства “Химреактив” (Россия). Во всех экспериментах использовали 0,05 М Na-фосфатный буфер, pH 7,5, содержащий 0,15 М NaCl (PBS).

Синтез препаратов поли-НИПАА гелей. К раствору 150 мг НИПАА и МБА (сшивающий агент, 0,4 – 5 мг) в 1 мл PBS добавляли инициаторы — 0,02 мл 0,78 М водного раствора персульфата аммония и 0,01 мл ТЕМЕД’а — и инкубировали при 20 °С в течение 1 ч до окончания процесса радикальной полимеризации. Полученные блоки помещали в избыток PBS и трижды нагревали до 70 °С с последующим охлаждением до 20 °С, чтобы отмыть гель от непрореагировавших веществ. Для экспериментов *in vitro* блоки нарезали на кусочки размерами 5 мм × 5 мм × 3 мм, для экспериментов *in vivo* гомогенизировали в ручном стеклянном гомогенизаторе (диаметр конечный частиц 0,06 – 0,12 мм). Для приготовления флуоресцеин-меченого геля 5 мг акрилоил-флуоресцеина

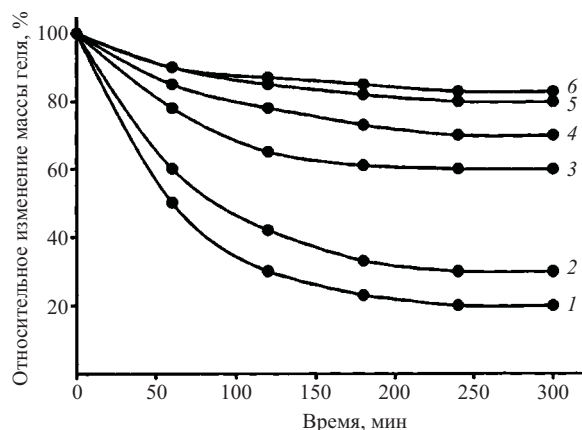


Рис. 1. Динамика относительного изменения массы поли-НИПАА геля в зависимости от степени его сшивки. Условные обозначения — концентрация сшивающего агента (N,N' -метилена-бисакриламид): 1 – 2,8 мМ, 2 – 3,9 мМ, 3 – 5,2 мМ, 4 – 6,5 мМ, 5 – 13,0 мМ, 6 – 32,5 мМ

добавляли к исходному раствору для полимеризации, после чего проводили все описанные выше процедуры.

Кинетика сжатия геля. Уравновешенные в PBS кусочки геля (24 ч при 20 °С) обсушивали фильтровальной бумагой и взвешивали (вес M_0). Далее они переносились в PBS при 37 °С и взвешивались по аналогичной процедуре через определенные интервалы времени (вес M_t). Степень гидратации определяли как отношение M_t/M_0 (%).

Кинетика выделения включенного в гель проксодолола. Кусочки геля уравнивали в 0,5 % растворе проксодолола в PBS (24 ч при 20 °С). Набухший гель взвешивали и рассчитывали количество включенного вещества из материального баланса. Далее переносили гель в 5 мл свежего PBS при 37 °С, через определенные интервалы времени отбирали аликвоты раствора и определяли в них концентрацию выделившегося проксодолола на спектрофотометре UV-265 (Shimadzu, Германия). Длина волны 271 нм, коэффициент молярного поглощения $1940 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Биологическую часть работы проводили на здоровых кроликах породы шиншилла массой 2,5 – 3,5 кг (по 15 особей в группе). Для определения способности термогеля сорбироваться на поверхности глазного яблока на глаз наносили либо суспензию поли-НИПАА, предварительно уравновешенную в 0,5 % растворе флуоресцеина, либо суспензию поли-НИПАА геля с ковалентно пришитым флуоресцеином (в качестве контроля в данных случаях использовали 0,5 % раствор флуоресцеина в PBS). При изучении гипотензивного действия проксодолола контрольной группе закапывали 30 μl PBS в правый глаз и 30 μl (0,5 или 1 %) раствора проксодолола в PBS в левый глаз. Для экспериментальной группы использовалась суспензия поли-НИПАА геля (300 мг набухшего геля на 1 мл PBS): 30 μl суспензии, уравновешенной в чистом буфере, и 30 μl суспензии, уравновешенной PBS, содержащем проксодолол, закапывали в правый и левый глаз каждого животного соответственно. ВГД измеряли через определенные промежутки времени при помощи тонометра Маклакова.

Результаты и их обсуждение

Предварительный цикл экспериментов *in vivo* был направлен на изучение принципиальной возможности сор-

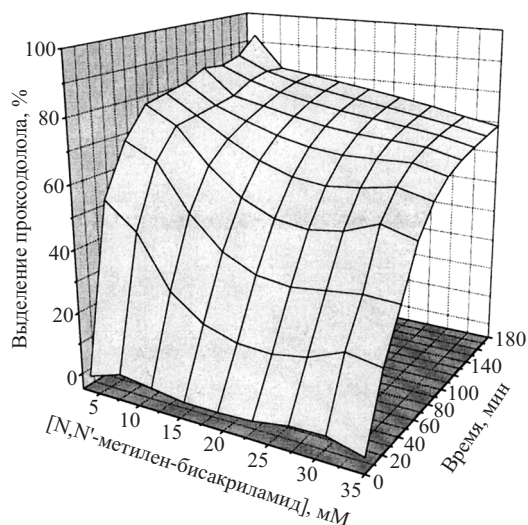


Рис. 2. Кинетика выделения проксодолола из поли-НИПАА геля в зависимости от концентрации сшивающего агента (N,N' -метилена-бисакриламид)

бции суспензии поли-НИПАА геля на поверхности роговицы и конъюнктивы и ее способности удерживать предварительно введенное в нее вещество в контакте с поверхностью глаза в течение длительного времени.

Установлено, что в контрольных экспериментах раствор флуоресцеина смывается слезной жидкостью за 1,5 – 2 мин. При закапывании в глаз суспензии поли-НИПАА геля, как ковалентно меченой флуоресцеином, так и предварительно уравновешенной в его растворе, гель частично смывается слезной жидкостью, а частично формируется на поверхности глаза окрашенное пятно примерно 8 мм в диаметре. При этом в обоих случаях окраска данного пятна визуально наблюдалась в течение по меньшей мере 1,5 ч. Эти эксперименты показали, что как сама суспензия поли-НИПАА геля, так и раствор вещества, в котором данная суспензия была предварительно уравновешена, способны относительно долгое время удерживаться на поверхности глаза.

Как говорилось ранее, фазовый переход термогелей обычно сопровождается сильным уменьшением их объема. Это означает, что при сорбции суспензии на поверхности глаза раствор лекарственного средства, предварительно введенный в гель, будет “выдавливаться” из носителя и непродуктивно смываться слезной жидкостью. Очевидно, что для эффективного применения в офтальмологии гель должен обладать как минимальной скоростью сжатия при температурном скачке 20 – 37 °С, так и минимальной абсолютной степенью сжатия. Из литературы известно, что фактором, определяющим такие свойства термочувствительных гелей, является степень их сшивки [14].

Кинетические кривые сжатия поли-НИПАА геля в зависимости от концентрации сшивающего агента (МБА) при температурном скачке 20 – 37 °С приведены на рис. 1. Из рисунка видно, что все препараты поли-НИПАА гелей достигают равновесной степени набухания за 5 ч. При концентрации МБА более 13 мМ препараты демонстрируют сходное поведение и сжимаются не более чем на 20 %. Однако кинетические закономерности выделения из поли-НИПАА проксодолола в тех же условиях не совпадают с кинетикой сжатия геля (рис. 2). Боль-

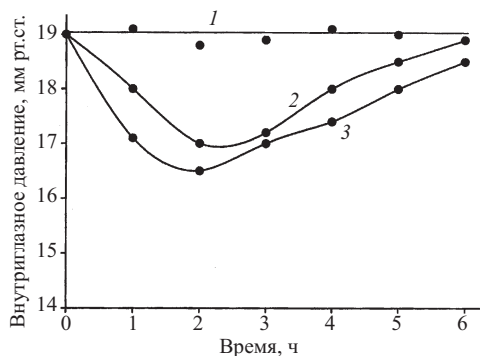


Рис. 3. Сравнительная оценка влияния водного раствора проксодолола 0,5 % и 1 % на внутриглазное давление интактных глаз кроликов. Условные обозначения: 1 — PBS, контроль, 2 — 0,5 % проксодолол, 3 — 1 % проксодолол

шая часть включенного в гель вещества (от 50 до 70 %) выделяется в течение первого получаса инкубации геля при 37 °С. Только при максимальной (32,5 мМ) концентрации сшивающего агента наблюдается пролонгация выделения проксодолола. В результате для экспериментов *in vivo* был выбран поли-НИПАА гель с концентрацией МБА 32,5 мМ (дальнейшее повышение степени сшивки геля, как было показано ранее [14], невозможно).

Установлено, что как сам PBS, так и уравновешенная в нем суспензия поли-НИПАА геля не оказывают существенного влияния на ВГД кроликов (рис. 3, 4).

Разница между традиционно применяемой и предлагаемой нами формами глазных капель проксодолола заключается в величине и продолжительности гипотензивного эффекта. После закапывания проксодолола в виде обычных глазных капель максимальное снижение ВГД (– 2 мм рт.ст. для 0,5 % и – 2,5 мм рт.ст. для 1 % растворов проксодолола) достигается примерно ко второму часу (рис. 3). При этом ВГД восстанавливается к исходному уровню примерно к 4-му и 6-му часу (соответственно для 0,5 и 1 % раствора проксодолола). Для тех же концентраций проксодолола, вводимых в виде суспензии поли-НИПАА геля, максимальное снижение ВГД (– 3 мм рт.ст. для 0,5 % и – 4,5 мм рт.ст. для 1 % растворов проксодолола) достигается к четвертому часу. Более того, заметный гипотензивный эффект при введении проксодолола в виде суспензии поли-НИПАА геля наблюдается даже после 24 ч после его введения. Данные результаты свидетельствуют о том, что суспензия поли-НИПАА геля может служить носителем офтальмологического средства, который способен не только обеспечить существенную пролонгацию его действия (в данном случае гипотензивного эффекта), но и способствовать уменьшению

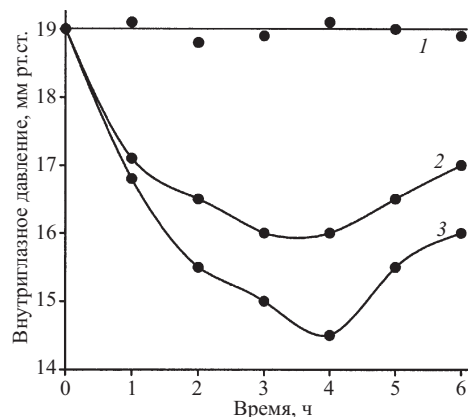


Рис. 4. Влияние проксодолола 0,5 % и 1 % в форме суспензии поли-НИПАА геля на внутриглазное давление интактных глаз кроликов. Условные обозначения: 1 — поли-НИПАА (контроль), 2 — поли-НИПАА + 0,5 % проксодолол, 3 — поли-НИПАА + 1 % проксодолол

концентрации препарата для достижения необходимого снижения офтальмотонуса.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант № 02-04-48700).

ЛИТЕРАТУРА

1. I. Ahmed and T. Patton, *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, **26**(2), 584 – 587 (1985).
2. U. F. Maichuk, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **14**(1), 87 – 90 (1975).
3. B. Yu, I. Kwon, Y. Kim, et al., *J. Control. Release*, **39**(1), 65 – 70 (1996).
4. Ю. Ф. Майчук, В. П. Еричев, *Вестник офтальмол.*, **15**(2), 47 – 49 (1981).
5. В. П. Еричев, Ю. Ф. Майчук, *Вестник офтальмол.*, **22**(5), 16 – 19 (1988).
6. C. Matschke, U. Isele, P. van Hoogevest, and A. Fahr, *J. Control. Release*, **85**(1), 1 – 15 (2002).
7. Л. И. Валуев, Т. А. Валуева, И. Л. Валуев, Н. А. Платэ, *Ученые биол. химии*, **43**, 307 – 328 (2003).
8. T. Tanaka, *Polymer*, **20**(6), 1404 – 1412 (1979).
9. T. Amiya and T. Tanaka, *Macromolecules*, **20**(11), 1162 – 1164 (1987).
10. A. S. Hoffman, *J. Control. Release*, **6**(3), 297 – 305 (1987).
11. R. M. Ottenbrite, S. J. Huang, and K. Park (eds.), *Hydrogels and Biodegradable Polymers for Bioapplications*, ACS, Washington (1996).
12. O. Chiantore, M. Guaita, and L. Trossarelli, *Macromol. Chem.*, **180**(8), 969 – 973 (1979).
13. G.-H. Hsiue, R. Chang, and C. Wang, *Biomaterials*, **24**(13), 2423 – 2430 (2003).
14. T. Norisuye, N. Masui, Y. Kida, et al., *Polymer*, **43**(20), 5289 – 5297 (2002).

Поступила 07.02.05

A THERMOSENSITIVE GEL SUSPENSION PROLONGING THE ACTION OF PROXODOLOL

N. L. Ereemeev¹, V. N. Ermakova², O. A. Kost¹, I. I. Nikol'skaya¹, P. A. Tsaitler¹

¹ Department of Chemistry, Moscow State University, Moscow, Russia;

² Helmholtz Institute of Eye Diseases, Moscow, Russia

A new form of ophthalmic preparations is proposed. A suspension of poly-N-isopropylacrylamide [poly(NIPAA)] gel is capable of effectively including a solution of physiologically active compound at room temperature. Upon application, this suspension forms a thin film on the eye surface and gradually releases the drug. Proxodolol in the form of a poly(NIPAA) gel suspension produces a more pronounced physiological effect in comparison to that of the traditional eye drops. The suspension of poly(NIPAA) gel itself does not affect intraocular pressure in rabbits, but leads to a significant prolongation of the action of drugs included into the gel.