



## Разработка и исследование мукоадгезивных микрокапсул для интраназальной доставки леводопы

Д. С. Гордеева<sup>1</sup>, В. В. Хуторянский<sup>2</sup>✉, Р. И. Мустафин<sup>1</sup>✉✉

<sup>1</sup> Институт фармации, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 420126, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Фатыха Амирхана, д. 16

<sup>2</sup> Reading School of Pharmacy, University of Reading, Whiteknights, PO box 224, Reading RG66AD, United Kingdom

✉ Контактное лицо: Хуторянский Виталий Викторович. E-mail: v.khutoryanskiy@reading.ac.uk

✉✉ Контактное лицо: Мустафин Руслан Ибрагимович. E-mail: ruslan.mustafin@kazangmu.ru

ORCID: Д. С. Гордеева – <https://orcid.org/0009-0000-8591-3121>;

В. В. Хуторянский – <https://orcid.org/0000-0002-7221-2630>;

Р. И. Мустафин – <https://orcid.org/0000-0002-0916-2853>.

Статья поступила: 29.08.2024

Статья принята в печать: 28.11.2024

Статья опубликована: 29.11.2024

### Резюме

**Введение.** Микроразмерные частицы представляют большой интерес для применения в различных системах доставки лекарств. Особое место занимает интраназальный способ введения благодаря ряду преимуществ, включая простоту применения, минимальные побочные эффекты и возможность быстрой доставки лекарственных веществ (ЛВ) непосредственно в мозг. Лекарство в составе микрочастиц действует локально, обеспечивая тем самым выход ЛВ в нужном количестве в органе-мишени. ЛВ из носа поступает напрямую в головной мозг через обонятельную область по чувствительным нервам. Разработка микроразмерных частиц, обладающих способностью к мукоадгезии на поверхности носовой слизистой, позволит увеличить биодоступность (БД) лекарств, применяемых в терапии заболеваний и нарушений центральной нервной системы (ЦНС).

**Цель.** Разработка и исследование микрокапсул, обладающих мукоадгезивными свойствами, для их использования в системе интраназальной доставки леводопы.

**Материалы и методы.** Микрокапсулы (МК) получали методом ультразвукового электрораспыления на инкапсуляторе В-390 (ВУСНІ, Швейцария) с последующей фильтрацией под вакуумом, промывкой деионизированной водой и высушиванием лиофильно при  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  и 0,05 мБар в течение 48 ч в сушилке FreeZone 1 L (Labconco, США). Изучение структурных особенностей МК проводилось методом оптической микроскопии с применением прямого микроскопа Evident CX33 с цифровой камерой высокого разрешения (Olympus, Япония). Для обработки изображений использовали программное обеспечение ImageView™. Оценку морфологии МК также проводили с применением портативного источника ультрафиолетового света (Jialitte F114, Китай) при помощи цифрового USB-микроскопа (OT-INL40 1000X, Китай). Исследование мукоадгезивных свойств МК, загруженных флуоресцеинатом натрия, проводилось с применением изолированной слизистой носа овцы в инкубаторе SI60 (Stuart, Великобритания) при температуре  $37,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Получение флуоресцентных изображений осуществлялось с применением системы визуализации высокого разрешения TLC Visualizer 3 (CAMAG®, Швейцария). Программное обеспечение ImageJ 1.53e (ImageJ, США) использовали для обработки полученных макроскопических изображений и построения графиков. Оценка эффективности инкапсуляции, % (ЭИ%), и загрузочной емкости, % (ЕЗ%), МК леводопой проводилась УФ-спектрофотометрически на приборе Evolution™ 220 (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 202 нм. Высвобождение леводопы из МК выполнялось на приборе «Проточная ячейка» CE 7smart (SOTAX AG, Швейцария), метод IV (Государственная фармакопея РФ XV издания, ГФ РФ XV), при температуре  $37 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 3 ч в среде искусственной назальной жидкости (ИНЖ). Количество высвобождавшегося ЛВ определялось на УФ-спектрофотометре Evolution™ 220 (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 202 нм.

**Результаты и обсуждение.** Разработана методика получения МК, подобраны параметры прибора и оптимальный состав микрочастиц. Было получено 2 типа МК: простые МК на основе альгината натрия и МК, покрытые Eudragit® EPO (EPO), обладающие мукоадгезивными свойствами. Средний диаметр простых МК составил  $0,365 \pm 0,018\text{ }\mu\text{m}$ , МК, покрытых EPO, –  $0,426 \pm 0,017\text{ }\mu\text{m}$ . Простые МК смываются с поверхности изолированной слизистой носа овцы через 5 мин после орошения ИНЖ, а МК, покрытые EPO, удерживаются в течение 1 ч. ЭИ% МК леводопой выше 90 %. ЕЗ% МК, покрытых EPO, больше, чем у простых МК. Выход леводопы в среду ИНЖ из МК, покрытых EPO, составил 100 % уже через 30 мин исследования, у простых МК – не более  $60 \pm 6,1\%$  через 3 ч.

**Заключение.** МК, покрытые ЕРО, обладают мукоадгезивными свойствами на поверхности слизистой носа, и их дальнейшее исследование является перспективным с целью применения в системах интраназальной доставки леводопы.

**Ключевые слова:** микрокапсулы, мукоадгезивная система доставки, леводопа, интраназальное введение лекарств, доставка из носа в мозг

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Вклад авторов.** Д. С. Гордеева осуществляла разработку методики получения микрочастиц, подбор параметров прибора и оптимального состава, их анализ, исследования по мукоадгезии и высвобождению леводопы, а также обработку результатов и написание драфта статьи. В. В. Хуторянский и Р. И. Мустафин принимали участие в концептуализации и методологии настоящей работы, а также осуществляли рецензирование и корректировку статьи. Все вышеуказанные авторы принимали участие в написании статьи.

**Финансирование.** Исследование было выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (научный проект № 23-15-00263).

**Благодарность.** Авторы благодарны немецкой компании Evonik Nutrition & Care GmbH за предоставление образца Eudragit® ЕРО. Также авторы выражают благодарность к. фарм. н., доценту А. Ю. Ситенкову за помощь в разработке методики получения микрочастиц и студенту Института фармации Абделькариму Эльмантаги за помощь в ходе мукоадгезивных исследований микрочастиц.

**Для цитирования:** Гордеева Д. С., Хуторянский В. В., Мустафин Р. И. Разработка и исследование мукоадгезивных микрокапсул для интраназальной доставки леводопы. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2024;13(4):129–138. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1918>

## Development and study of mucoadhesive microcapsules for the nasal levodopa delivery

Daria S. Gordeeva<sup>1</sup>, Vitaliy V. Khutoryanskiy<sup>2</sup>✉, Rouslan I. Moustafine<sup>1</sup>✉✉

<sup>1</sup> Institute of Pharmacy, Kazan State Medical University, 16, Fatykha Amirkhan str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420126, Russia

<sup>2</sup> Reading School of Pharmacy, University of Reading, Whiteknights, PO box 224, Reading RG66AD, United Kingdom

✉ **Corresponding author:** Vitaliy V. Khutoryanskiy. **E-mail:** v.khutoryanskiy@reading.ac.uk

✉✉ **Corresponding author:** Rouslan I. Moustafine. **E-mail:** ruslan.mustafin@kazangmu.ru

**ORCID:** Daria S. Gordeeva – <https://orcid.org/0009-0000-8591-3121>;

Vitaliy V. Khutoryanskiy – <https://orcid.org/0000-0002-7221-2630>;

Rouslan I. Moustafine – <https://orcid.org/0000-0002-0916-2853>.

**Received:** 29.08.2024

**Accepted:** 28.11.2024

**Published:** 29.11.2024

### Abstract

**Introduction.** Microparticles are of great interest for use in various drug delivery systems. The intranasal route of administration holds a special place due to its several advantages, including ease of use, minimal side effects, and the ability for rapid delivery of drug directly to the brain. The drug in the microparticles acts locally, thereby ensuring the release of the drug in the required amount in the target organ. The drug from the nose enters directly into the brain through the olfactory region along the sensory nerves. The development of microparticles with the ability to mucoadhesion on the surface of the nasal mucosa will increase the bioavailability of drugs used in the treatment of diseases and disorders of the central nervous system (CNS).

**Aim.** Development and study of microcapsules with mucoadhesive properties for the intranasal delivery system of levodopa.

**Materials and methods.** Microcapsules (MC) were obtained by ultrasonic electro spraying method on a B-390 encapsulator (BUCHI, Switzerland) followed by filtration under vacuum, washing with deionized water and freeze-drying at  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  and 0.05 mBar for 48 h in a FreeZone 1 L dryer (Labconco, USA). The structural features of MC were studied by optical microscopy using Evident CX33 microscope with high-resolution camera (Olympus, Japan). For evaluation of the images, we used ImageView™ software (version x64, 4.11.22376.20230402). Morphology of prepared microcapsules were also detected using a portable ultraviolet light source (Jialitte F114, China) by a digital USB microscope (OT-INL40 1000X, China). The mucoadhesive properties of sodium fluoresceinate-loaded MC were studied using isolated sheep nasal mucosa in an SI60 incubator (Stuart, UK) at  $37.0 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Fluorescent images were obtained using a TLC Visualizer 3 high-resolution imaging system (CAMAG®, Switzerland). ImageJ 1.53e software (ImageJ, USA) was used to process the obtained macroscopic images and plot graphs. The encapsulation efficiency, % (EE%) and loading capacity, % (LC%) of levodopa loaded MC were assessed using UV spectrophotometry on an Evolution™ 220 device (Thermo Fisher Scientific, USA) at a wavelength of 202 nm. The release of levodopa from MC was performed using a CE 7smart flow cell (SOTAX AG, Switzerland), method IV (State Pharmacopoeia XV of the Russian Federation), at a temperature of  $37 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 3 hours in an artificial nasal fluid (ANF) medium. The amount of released drug was determined using an Evolution™ 220 UV spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) at a wavelength of 202 nm.

**Results and discussion.** A method for MC preparation was developed, the device parameters and the optimal composition of microparticles were selected. Two types of MC were obtained: alginate MC and MC coated with Eudragit® EPO (EPO), which have mucoadhesive properties. The average diameter of alginate MC was  $0.365 \pm 0.018$  mm, EPO-coated MC –  $0.426 \pm 0.017$  mm. Alginate MC are washed off the surface of isolated sheep nasal mucosa 5 minutes after irrigation with ANF, and EPO-coated are retained for 1 hour. EE% of MC with levodopa is above 90 %. LC% of EPO-coated is higher than that of alginate MC. The release of levodopa into the ANF medium from EPO-coated MC was 100 % after just 30 minutes of the study, while for alginate MC it was no more than  $60 \pm 6.1$  % after 3 hours.

**Conclusion.** EPO-coated MCs exhibit mucoadhesive properties on the nasal mucosa surface and their further study is promising for use in intranasal levodopa delivery systems.

**Keywords:** microcapsules, mucoadhesive delivery system, levodopa, intranasal drug delivery, nose to brain delivery

**Conflict of interest.** The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Contribution of the authors.** Daria S. Gordeeva developed the method for obtaining microparticles, selected the device parameters and optimal composition, analyzed them, studied mucoadhesion and levodopa release, processed the results and wrote the draft of the article. Vitaliy V. Khutoryanskiy and Rouslan I. Moustafine participated in the conceptualization and methodology of this work, and reviewed and corrected the article. All the above-mentioned authors participated in writing the article.

**Funding.** The study was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (RSF № 23-15-00263).

**Acknowledgment.** The authors are grateful to the German company Evonik Nutrition & Care GmbH for providing a sample of Eudragit® EPO. The authors also express their gratitude to Dr. A. Yu. Sitenkov for his help in the development of methodology used for the preparation of microcapsules and to Abdelkarim Elmantagui, a student of the Institute of Pharmacy, for his assistance during mucoadhesive studies of microparticles.

**For citation:** Gordeeva D. S., Khutoryanskiy V. V., Moustafine R. I. Development and study of mucoadhesive microcapsules for the nasal levodopa delivery. *Drug development & registration*. 2024;13(4):129–138. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1918>

## ВВЕДЕНИЕ

Микрочастицы имеют размер в диапазоне 1–1000 мкм и за счет своих структурных особенностей имеют ряд преимуществ, поэтому могут быть использованы в различных системах доставки лекарств [1, 2]. Микрочастицы в силу своего размера не проникают в межклеточное пространство и, таким образом, действуют локально [3]. Для получения микрочастиц используются полимеры природного и синтетического происхождения [4–6]. Также в производстве микрочастиц применяются производные целлюлозы [7–9], другие полисахариды [10–12] и белки [13–16]. Для сшивания и укрепления микрочастиц применяют соединения неполимерной и полимерной природы:  $\text{CaCl}_2$ , глутаровый альдегид и поли-L-лизин соответственно, а также ряд других веществ. Природные полимеры обладают хорошей биоразлагаемостью, а продукты их разложения безопасны и нетоксичны для человеческого организма. Однако, сложно обеспечить постоянство параметров качества полимеров (в том числе размер, механиче-

ские свойства и др.) между партиями производимых частиц. Микрочастицы на основе синтетических полимеров характеризуются очень хорошими механическими свойствами, стабильностью и контролируемым высвобождением ЛВ [17].

Микросферы и МК привлекают большое внимание с точки зрения применения их в различных системах доставки лекарств. Микросферы – это матричные системы, в которых лекарство диспергировано, растворено или суспендировано равномерно и однородно [18]. Обычно они обладают плохой растворимостью в воде, но имеют способность к ее поглощению, в результате чего набухают с образованием геля [19]. МК – это гетерогенные частицы, которые имеют ядро (резервуар) и оболочку (мембрану) [20]. Данный тип «ядро – оболочка» позволяет создавать системы с заданными свойствами. Ядро может быть жидким, твердым или газообразным, а оболочка обычно твердая и может быть изготовлена из различных материалов [21]. Кроме того, ЛВ может быть загружено в разные слои ядра или

оболочки, чтобы оно могло последовательно высвободиться в организме [22, 23]. В МК можно инкапсулировать как липофильные, так и гидрофильные материалы [24].

Интраназальная доставка микрочастиц обеспечивает местное или системное действие лекарства, способствуя быстрому всасыванию и началу действия [25–28]. Интраназальное введение ЛВ в составе микрочастиц для доставки в мозг в терапии заболеваний ЦНС увеличивает БД препаратов и повышает эффективность фармакотерапии. В литературе имеется ряд исследований по разработке микрочастиц для доставки ЛВ интраназально в терапии расстройств ЦНС. Например, БД лоразепама была увеличена за счет пролонгации высвобождения ЛВ на поверхности назальной слизистой при использовании микросфер на основе Pluronic марок PF-127 и PF-68 в терапии судорожных состояний и эпилептического статуса [29]. Микросферы с применением этилцеллюлозы и хитозана для интраназальной доставки ривастигмина для лечения болезни Альцгеймера показали хорошие результаты поведенческих тестов у крыс *in vivo* [30]. Хитозановые микросферы, полученные методом распылительной сушки, повысили БД (118 %) метотрексата в сравнении с раствором лекарства, введенного интраназально. После внутривенного введения метотрексата ЛВ в срезах мозга крыс обнаружено не было [31]. Мукоадгезивные микросферы на основе гидроксипропилметилцеллюлозы обеспечивают быструю доставку трамадола гидрохлорида в головной мозг при его интраназальном введении, что было доказано в радиовизуализирующем исследовании на кроликах [32]. Интраназальная доставка дефероксамина мезилата в составе микрочастиц хитозана и метил- $\beta$ -циклодекстрина обеспечивает концентрацию ЛВ в спинномозговой жидкости от  $3,83 \pm 0,68$  мкг/мл (микрочастицы хитозана) до  $14,37 \pm 1,69$  мкг/мл (микрочастицы метил- $\beta$ -циклодекстрина) через 30 мин после введения [33].

**Целью настоящего исследования** стала разработка и исследование микрокапсул, обладающих мукоадгезивными свойствами, для их использования в системе интраназальной доставки леводопы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе для получения МК был использован альгинат натрия (Panreac, ЕС) с молекулярной массой 10 000–600 000 г/моль, сшивающим агентом выступал хлорид кальция. Для создания МК, обладающих мукоадгезивными свойствами, их покрывали Eudragit® EPO (EPO), терполимером *N,N*-диметиламиноэтилметакрилата с метилметакрилатом и бутилметакрилатом (молярное соотношение 2:1:1, ММ 150 кДа) (Evonik Nutrition & Care GmbH, Германия). Раствор EPO получали путем его растворения в деионизированной воде с доведением pH до 6,0 с применением растворов 1 н NaOH и 1 н HCl. Для создания МК, загруженных ЛВ,

раствор альгината натрия готовили в водном растворе леводопы (Sigma-Aldrich, Великобритания) с концентрацией 1 мг/мл. МК получали методом ультразвукового электрораспыления на инкапсуляторе B-390 (BUCHI, Швейцария) с использованием одинарной головки и форсунки диаметром 200 мкм. Параметры прибора: давление – 130–150 мбар, частота ультразвука – 800 Гц, напряжение электрического поля – 1100 В. Затем МК отфильтровывали под вакуумом, промывали деионизированной водой и высушивали лиофильно при  $-50$  °C и 0,05 мбар в течение 48 ч в сушилке FreeZone 1 L (Labconco, США) [34].

Определение размеров и структурных особенностей МК проводилось путем оптической микроскопии с применением прямого микроскопа Evident CX33 (Olympus, Япония), а также в УФ-свете с применением портативного источника ультрафиолетового света (Jialitte F114, КНР) при помощи цифрового USB-микроскопа (OT-INL40 1000X, КНР). Обработка полученных изображений и оценка размеров проводилась с использованием программного обеспечения ImageJ 1.53e (ImageJ, США).

Для анализа мукоадгезивных свойств микрочастиц использовали изолированную слизистую носа овцы, которую получали путем диссекции носовой перегородки из голов овец [35]. Головы получали из местной скотобойни и транспортировали в лабораторию в переносном холодильнике с температурным режимом от 3 до 4 °C. Носовую перегородку ( $1,5 \times 1,0$  см) извлекали с помощью ножниц. Все ткани были использованы в течение 24 ч после убоя животных. Исследования мукоадгезивных свойств проводили по методике, разработанной в университете Рединга [36]. В ходе изучения мукоадгезивных свойств МК частицы нагружали флуоресцеинатом натрия (Sigma-Aldrich, Великобритания) в концентрации 0,1 мг/мл. 0,1 г лиофильно высушенных МК, загруженных флуоресцеинатом натрия, помещали на изолированную слизистую носа овцы и размещали в инкубаторе SI60 (Stuart, Великобритания) с температурным режимом  $37,0 \pm 0,5$  °C. Затем в течение 1 ч проводили смыв с использованием ИНЖ при помощи шприцевого дозатора (Legato® 110, KD Scientific Inc., США) со скоростью 0,2 мл/мин и получали флуоресцентные изображения с применением системы визуализации высокого разрешения TLC Visualizer 3 (CAMAG®, Швейцария). ИНЖ получали с использованием 7,45 г NaCl, 1,29 г KCl и 0,24 г безводного CaCl<sub>2</sub> (pH 5,8) в 1000 мл деионизированной воды. Каждый эксперимент повторяли трижды. Программное обеспечение ImageJ 1.53e (ImageJ, США) использовали для обработки полученных макроскопических изображений и построения графиков.

Расчет эффективности инкапсуляции (ЭИ%) (1) и загрузочной емкости (ЕЗ%) (2) МК леводопой проводился по формулам:

$$\text{ЭИ}\% = \frac{M(\text{инкапсулированное ЛВ})}{M(\text{исходное ЛВ})} \cdot 100\%, \quad (1)$$

$$\text{ЕЗ}\% = \frac{M(\text{инкапсулированное ЛВ})}{M(\text{сухие МК})} \cdot 100\%, \quad (2)$$

$M(\text{инкапсулированное ЛВ}) =$

$M(\text{исходное ЛВ}) - M(\text{неинкапсулированное ЛВ}),$

где  $M_{\text{исходное ЛВ}}$  – исходное количество ЛВ;

$M_{\text{неинкапсулированное ЛВ}}$  – количество ЛВ в ретикуляционном растворе, не инкапсулированного в МК, после фильтрации;

$M_{\text{осажденное ЛВ}}$  – количество ЛВ, осажденного на последнем этапе приготовления.

Определение количества леводопы проводили УФ-спектрофотометрически на приборе Evolution™ 220 (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 202 нм. Результаты количественно сравнивали с калибровочной кривой, полученной из стандартов леводопы 2, 4, 6, 8, 10 мкг/мл ( $r^2 = 0,9969$ ).

Высвобождение леводопы из простых МК и МК, покрытых ЕРО, проводилось на приборе «Проточная ячейка» CE 7smart (SOTAX AG, Швейцария), метод IV (ГФ РФ XV), при температуре  $37,0 \pm 0,5$  °С в течение 3 ч. В среде ИНЖ (рН 5,8). 0,05 г лиофильно высушенных МК, загруженных леводопой, помещали в ячейку диаметром 22,6 мм вместе со стеклянными шариками диаметром 1 мм во избежание их всплывания в процессе эксперимента и обеспечения ламинарного потока среды растворения. Скорость потока была подобрана наименьшей (2 мл/мин) с точки зрения максимального приближения к условиям передвижения секрета в назальной области. Каждые 30 мин проводился отбор проб. Количество высвободившейся леводопы определялось УФ-спектрофотометрически на приборе Evolution™ 220 (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 202 нм. Результаты количественно сравнивали с калибровочной кривой, полученной из стандартов леводопы 2, 4, 6, 8, 10 мкг/мл ( $r^2 = 0,9969$ ).

Статистический анализ проводился с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и двустороннего  $t$ -критерия Стьюдента в программном обеспечении Microsoft Excel, где  $p < 0,05$  считалось значимым. Все результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (СО).

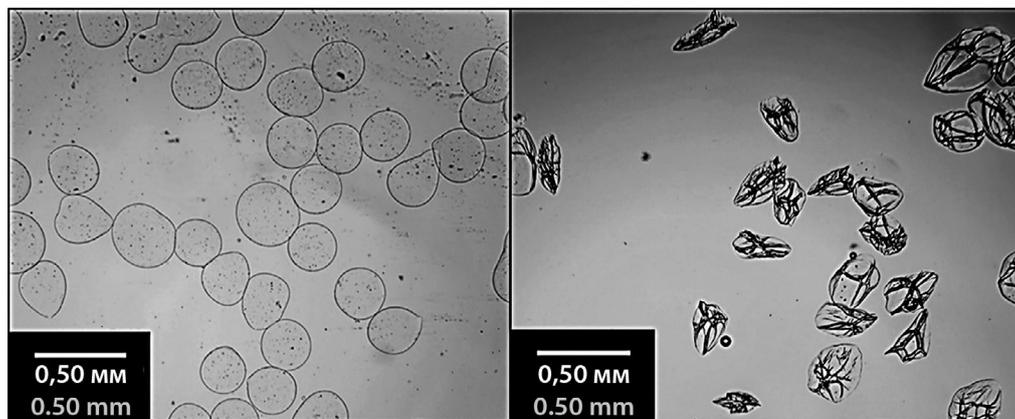
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методом ультразвукового электрораспыления нами было получено 2 типа МК: простые, которые выступали в качестве отрицательного контроля, и МК, покрытые полимером ЕРО, обладающие мукоадгезивными свойствами. В структуре ЕРО присутствуют диметиламиногруппы, которые за счет частичного положительного заряда обеспечивают электростатическое взаимодействие с отрицательно заряженными муцинами слизистой [37, 38]. Наличие ЕРО на поверхности МК способствует адгезии частиц на поверхности слизистой носа, что, в свою очередь, приводит к повышению БД ЛП и эффективности фармакотерапии.

Нами был подобран оптимальный состав для получения простых МК: 1,0%-й альгинат натрия (капсулообразующий раствор) / 0,5%-й  $\text{CaCl}_2$  (ретикуляционный раствор). Результаты оптической микроскопии простых МК до и после лиофильного высушивания представлены на рисунке 1. После получения МК круглой формы, в растворе также имеются деформированные частицы. После лиофильного высушивания, ввиду удаления жидкости, МК теряют свою первоначальную сферическую форму.

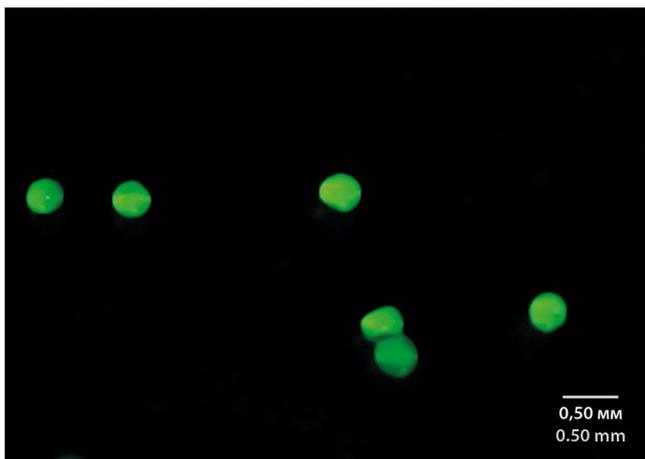
С целью более детального изучения МК и определения их размеров микроскопию проводили в УФ-свете. Для этого в раствор альгината натрия вводили флуоресцеинат натрия (рисунок 2). Средний диаметр МК составил  $0,365 \pm 0,018$  мм ( $n = 5$ ).

В ходе исследования для разработки МК, покрытых ЕРО, мы пробовали различные составы частиц с введением дополнительных вспомогательных веществ, так как после лиофильного высушивания МК



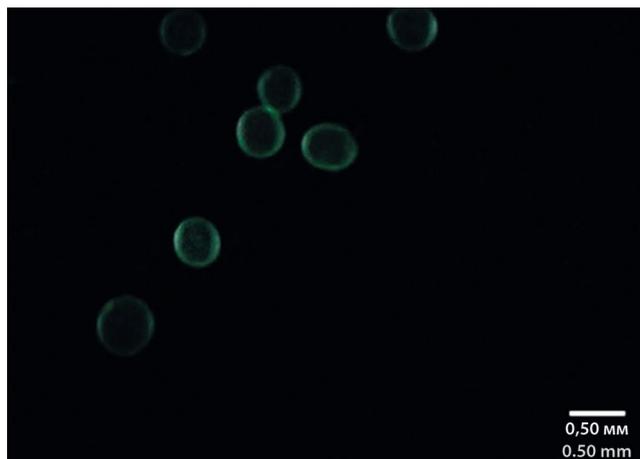
**Рисунок 1.** Микроскопия простых микрокапсул до и после лиофильного высушивания. Масштаб – 0,50 мм

**Figure 1.** Microscopy of alginate microcapsules before and after freeze drying. Scale bar – 0.50 mm



**Рисунок 2.** Микроскопия простых микрокапсул, загруженных флуоресцеинатом натрия, в УФ-свете. Масштаб – 0,50 мм

**Figure 2.** Microscopy of alginate microcapsules loaded with sodium fluorescein in UV light. Scale bar – 0.50 mm

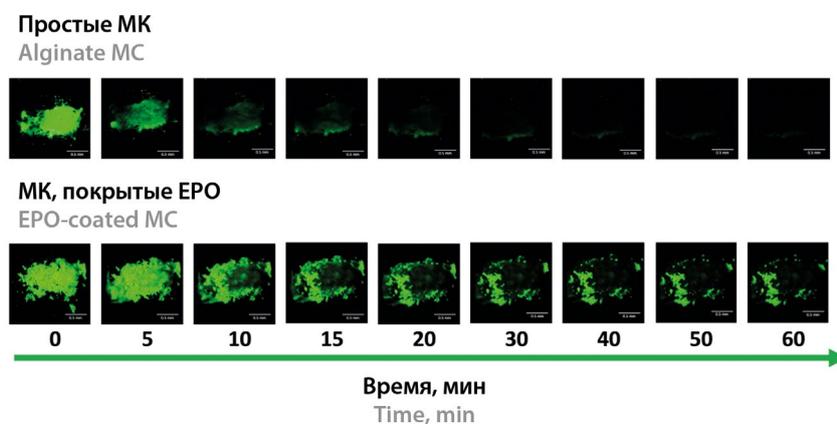


**Рисунок 3.** Микроскопия микрокапсул, покрытых FEPO, в УФ-свете. Масштаб – 0,50 мм

**Figure 3.** Microscopy of FEPO-coated microcapsules in UV light. Scale bar – 0.50 mm

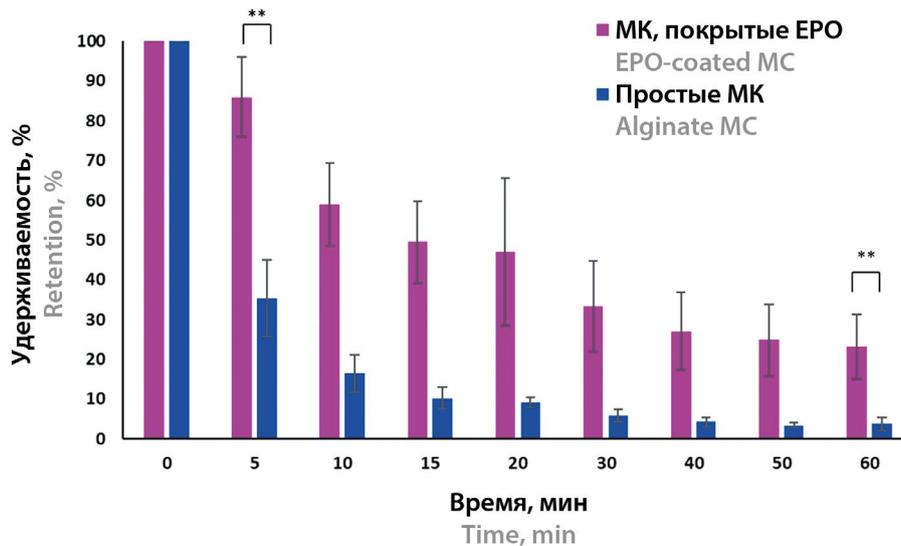
агрегировали и слипались, образуя жесткий конгломерат. В результате мы подобрали оптимальный состав МК, покрытых EPO: 1,0%-й альгинат натрия (капсулообразующий раствор) / 0,5%-й  $\text{CaCl}_2$  + 0,5%-й EPO с pH 6,0 (ретикуляционный раствор). МК, покрытые EPO, после лиофильного высушивания, представляли собой порошок белого цвета без запаха. С целью детального изучения микрочастиц и подтверждения наличия EPO на их поверхности, мы провели оптическую микроскопию МК с использованием флуоресцентно-меченого EPO (FEPO) (рисунок 3) [39]. Флуоресцентное свечение оболочки микрочастиц в УФ-свете подтверждает наличие полимера на поверхности МК. Средний диаметр МК, покрытых EPO, составил  $0,426 \pm 0,017$  мм ( $n = 5$ ).

Ввиду того, что данное исследование направлено на разработку интраназальной и мукоадгезивной системы доставки лекарств для терапии заболеваний ЦНС, была проведена оценка удерживаемости простых МК (отрицательный контроль) и МК, покрытых EPO, загруженных флуоресцеинатом натрия, на поверхности изолированной слизистой носа овцы в УФ-свете. Флуоресцентные изображения слизистой представлены на рисунке 4. В результате было доказано, что наличие EPO на поверхности МК обеспечивает адгезию МК к слизистой. Простые МК смываются с поверхности слизистой через 5 мин после орошения ИНЖ, а через 10 мин – полностью отсутствуют. МК, покрытые EPO, в свою очередь, удерживаются на изолированной слизистой носа в течение 1 ч (рисунок 5). Диметиламиногруппы в составе EPO на по-



**Рисунок 4.** Флуоресцентные изображения изолированной слизистой оболочки носа овцы с нанесенными простыми микрокапсулами и микрокапсулами, покрытыми EPO, загруженными флуоресцеинатом натрия в концентрации 0,1 мг/мл, после ее орошения ИНЖ. Масштаб – 500 мкм

**Figure 4.** Fluorescent images of isolated sheep nasal mucosa coated with alginate microcapsules and EPO-coated microcapsules loaded with 0.1 mg/ml sodium fluorescein after washing with ANF. Scale bar is 500  $\mu\text{m}$



**Рисунок 5.** Результаты удерживаемости простых микрокапсул и микрокапсул, покрытых EPO, загруженных флуоресцеином натрия 0,1 мг/мл, на изолированной слизистой оболочке носа овцы после ее орошения ИНЖ (pH = 5,8). Удерживаемость, %, представлена как среднее значение  $\pm$  CO ( $n = 3$ ).

Достоверные различия:  $**p < 0,005$

**Figure 5.** Retention results of alginate microcapsules and EPO-coated microcapsules loaded with 0.1 mg/mL sodium fluorescein on isolated sheep nasal mucosa after washing with ANF (pH = 5.8). Retention, % is presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

Significant differences:  $**p < 0.005$

верхности МК, по всей видимости, взаимодействуют с отрицательно заряженными фрагментами муцинов слизистой электростатически, тем самым придавая частицам мукоадгезивные свойства. За счет этого может повышаться БД лекарств, введенных в состав МК.

На следующем этапе работы необходимо было загрузить МК ЛВ – леводопой и оценить показатели ЭИ% и ЕЗ%. Леводопа – это основной препарат, применяемый в заместительной фармакотерапии болезни Паркинсона (БП). Леводопа относится к предшественникам дофамина, способна проходить через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и путем декарбоксилирования образует дофамин. БД леводопы в головном мозге составляет 1–3 %, большая часть дофамина образуется на периферии, что ведет к различным побочным эффектам [40, 41]. Интраназальное введение леводопы поможет повысить БД ЛВ и снизить частоту нежелательных лекарственных реакций.

ЭИ% и ЕЗ% простых МК и МК, покрытых EPO, леводопой представлены в таблице 1. ЭИ% показала отличные результаты, выше 90 %. ЕЗ% МК, покрытых EPO, больше, чем у простых МК.

В исследовании высвобождения леводопы из простых МК и МК, покрытых EPO, по методу IV «Проточная ячейка» (ГФ РФ XV) на приборе SE 7smart (SOTAX AG, Швейцария) выход ЛВ из МК, покрытых EPO, составил  $100 \pm 13,1$  % через 30 мин, что может быть связано с разрушением МК в ходе анализа и стремительным высвобождением леводопы в ИНЖ.

В то же время высвобождение ЛВ из простых МК составило не более  $60 \pm 6,1$  % за тот же интервал времени эксперимента. Результаты представлены на рисунке 6.

**Таблица 1.** ЭИ% и ЕЗ% простых микрокапсул и микрокапсул, покрытых EPO.

Результаты представлены как ЭИ% и ЕЗ%  $\pm$  CO ( $n = 3$ )

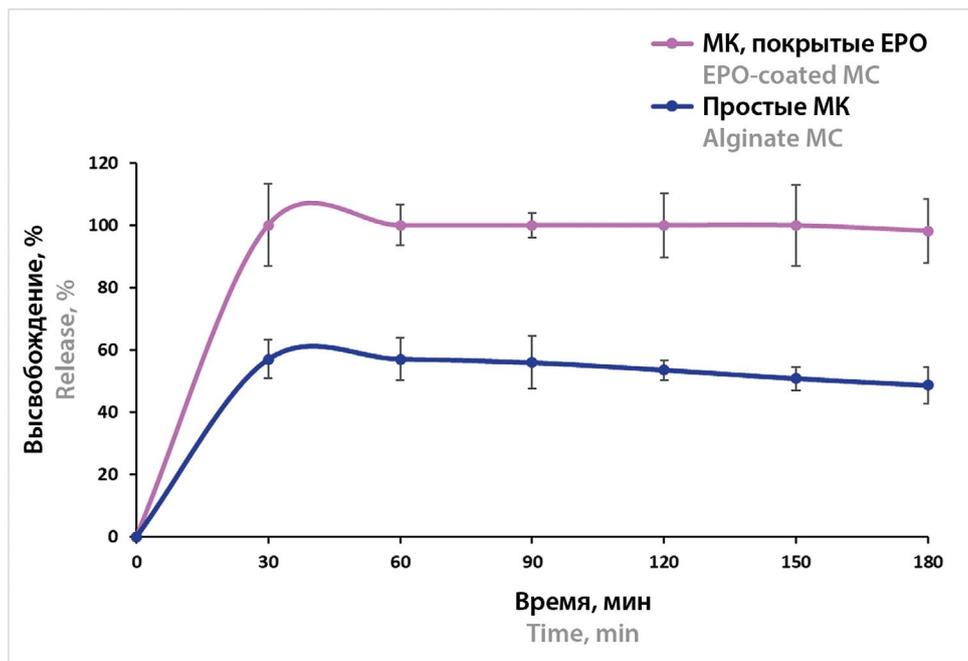
**Table 1.** EE% and LC% of alginate microcapsules and EPO-coated microcapsules.

Results are presented as EE% and LC%  $\pm$  SD ( $n = 3$ )

МК MC	ЭИ% EE%	ЕЗ% LC%
Простые МК Alginate MC	94,3 $\pm$ 0,9	18,2 $\pm$ 2,9
МК, покрытые EPO EPO-coated MC	95,5 $\pm$ 0,8	33,6 $\pm$ 9,9

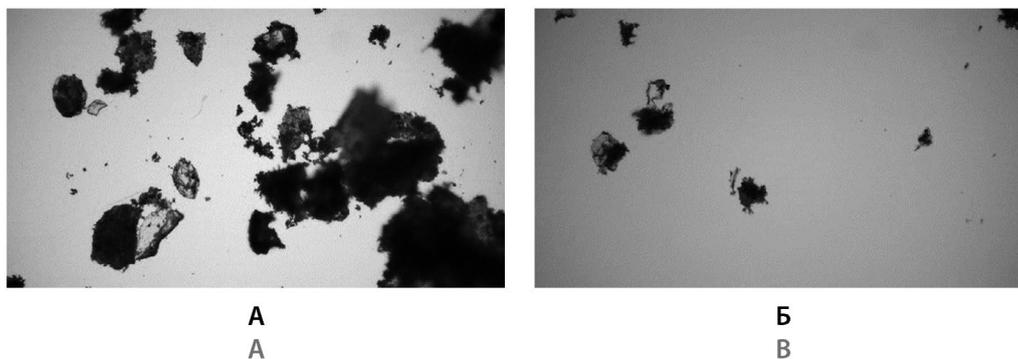
Для анализа структурных изменений микрочастиц в ходе анализа высвобождения ЛВ из МК дополнительно была проведена оптическая микроскопия лиофильно высушенных образцов до и после исследования высвобождения. Исследование МК, покрытых EPO, показало, что после высвобождения большая часть микрочастиц разрушена, тогда как простые МК сохраняют свою целостность (рисунок 7).

Таким образом, можно сделать вывод, что покрытие простых альгинатных МК противоположно заряженным терполимером EPO приводит, с одной сто-



**Рисунок 6.** Результаты высвобождения леводопы из простых микрокапсул и микрокапсул, покрытых ЕРО, в среде ИНЖ (рН 5,8) на приборе «Проточная ячейка» в течение 3 ч. Высвобождение, %, представлено как среднее  $\pm$  СО ( $n = 3$ )

**Figure 6.** Results of levodopa release from alginate microcapsules and EPO-coated microcapsules in ANF (pH 5.8) using the "Flow Cell" device during 3 h. Release, % is presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ )



**Рисунок 7.** Микроскопия лиофильно высушенных микрокапсул, покрытых ЕРО, до (А) и после (Б) анализа высвобождения леводопы из микрочастиц

**Figure 7.** Microscopy of lyophilized EPO-coated microcapsules before (A) and after (B) analysis of levodopa release from the microparticles

роны, к увеличению длительности удерживания микрочастиц на поверхности слизистой, а с другой – к ускоренному высвобождению включенного ЛВ, что и должно обеспечивать увеличение БД леводопы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате данного исследования было получено 2 типа МК методом ультразвукового электро-распыления. МК, покрытые ЕРО, обладают улучшен-

ными мукоадгезивными свойствами и обеспечивают быстрый выход леводопы на поверхности изолированной слизистой носа овцы. Дальнейшее исследование МК, покрытых ЕРО, с целью применения их в системах интраназальной доставки леводопы является перспективным направлением. БД леводопы повысится, а частота побочных эффектов снизится, что, в свою очередь, позволит увеличить эффективность фармакотерапии.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bale S., Khurana A., Reddy A. S. S., Singh M., Godugu C. Overview on Therapeutic Applications of Microparticulate Drug Delivery Systems. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2016;33(4):309–361. DOI: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2016015798.
- Galogahi F. M., Zhu Y., An H., Nguyen N.-T. Core-shell microparticles: Generation approaches and applications. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*. 2020;5(4):417–435. DOI: 10.1016/j.jsamd.2020.09.001.
- Wang B., Hu L., Siahaan T. J. Drug Delivery to the Lymphatic System. In: *Drug Delivery: Principles and Applications*. Hoboken: John Wiley and Sons Inc.; 2016. 509 p.
- Fundueanu G., Constantin M., Esposito E., Cortesi R., Nastuzzi C., Menegatti E. Cellulose acetate butyrate microcapsules containing dextran ion-exchange resins as self-propelled drug release system. *Biomaterials*. 2005;26(20):4337–4347. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.036.
- Jelvehgari M., Siahi-Shadbad M. R., Azarmi S., Martin G. P., Nokhodchi A. The microsphere delivery system of benzoyl peroxide: Preparation, characterization and release studies. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006;308(1–2):124–132. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.11.001.
- Koga C. C., Lee S.-Y., Lee Y. Consumer Acceptance of Bars and Gummies with Unencapsulated and Encapsulated Resveratrol. *Journal of Food Science*. 2016;81:1222–1229. DOI: 10.1111/1750-3841.13274.
- Brannigan R. P., Khutoryanskiy V. V. Progress and Current Trends in the Synthesis of Novel Polymers with Enhanced Mucoadhesive Properties. *Macromolecular Bioscience*. 2019;19(10):1900194. DOI: 10.1002/mabi.201900194.
- Chowdary K. P. R., Srinivasa Rao Y. Design and in vitro and in vivo evaluation of mucoadhesive microcapsules of glipizide for oral controlled release: A technical note. *AAPS PharmSciTech*. 2003;4:39. DOI: 10.1208/pt040339.
- Mansuri S., Kesharwani P., Jain K., Tekade R. K., Jain N. K. Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. *Reactive & Functional Polymers*. 2016;100:151–172. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2016.01.011.
- Mahdi M. H., Conway B. R., Smith A. M. Development of mucoadhesive sprayable gellan gum fluid gels. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;488(1–2):12–19. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.04.011.
- Petri D. F. S. Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications. *Journal of Applied Polymer Science*. 2015;132(23):42035. DOI: 10.1002/app.42035.
- Varshosaz J., Ahmadi F., Emami J., Tavakoli N., Minaian M., Mahzouni P., Dorkoosh F. Microencapsulation of budesonide with dextran by spray drying technique for colon-targeted delivery: An *in vitro/in vivo* evaluation in induced colitis in rat. *Journal of Microencapsulation*. 2011;28(1):62–73. DOI: 10.3109/02652048.2010.529947.
- Foxx M., Zilberman M. Drug delivery from gelatin-based systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2015;12:1547–1563. DOI: 10.1517/17425247.2015.1037272.
- Inada A., Oue T., Yamashita S., Yamasaki M., Oshima T., Matsuyama H. Development of highly water-dispersible complexes between coenzyme Q10 and protein hydrolysates. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;136:104936. DOI: 10.1016/j.ejps.2019.05.014.
- Ju Z. Y., Kilara A. Gelation of pH-Aggregated Whey Protein Isolate Solution Induced by Heat, Protease, Calcium Salt, and Acidulant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998;8561:1830–1835.
- Ruan L., Su M., Qin X., Ruan Q., Lang W., Wu M., Chen Y., Lv Q. Progress in the application of sustained-release drug microspheres in tissue engineering. *Materials Today Bio*. 2022;16:100394. DOI: 10.1016/j.mtbio.2022.100394.
- Shatabayeva E. O., Kaldybekov D. B., Ulmanova L., Zhaisanbayeva B. A., Mun E. A., Kenessova Z. A., Kudaibergenov S. E., Khutoryanskiy V. V. Enhancing Mucoadhesive Properties of Gelatin through Chemical Modification with Unsaturated Anhydrides. *Biomacromolecules*. 2024;25(3):1612–1628. DOI: 10.1021/acs.biomac.3c01183.
- Whelehan M., Marison I. W. Microencapsulation using vibrating technology. *Journal of Microencapsulation*. 2011;28:669–688. DOI: 10.3109/02652048.2011.586068.
- Pereswetoff-Morath L. Microspheres as nasal drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1998;29(1–2):185–194. DOI: 10.1016/S0169-409X(97)00069-0.
- Peanparkdee M., Iwamoto S., Yamauchi R. Microencapsulation: A Review of Applications in the Food and Pharmaceutical Industries. *Reviews in Agricultural Science*. 2016;4:56–65. DOI: 10.7831/ras.4.56.
- Ramli R. A., Laftah W. A., Hashim S. Core-shell polymers: a review. *RSC Advances*. 2013;3(36):15543–15565. DOI: 10.1039/C3RA41296B.
- De Cock L. J., De Koker S., De Geest B. G., Grooten J., Vervaet C., Remon J. P., Sukhorukov G. B., Antipina M. N. Polymeric multilayer capsules in drug delivery. *Angewandte Chemie International Edition*. 2010;49(39):6954–6973. DOI: 10.1002/anie.200906266.
- Yang X.-L., Ju X.-J., Mu X.-T., Wang W., Xie R., Liu Z., Chu L.-Y. Core-Shell Chitosan Microcapsules for Programmed Sequential Drug Release. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2016;8(16):10524–10534. DOI: 10.1021/acsami.6b01277.
- Wang W., Luo T., Ju X.-J., Xie R., Liu L., Chu L.-Y. Microfluidic preparation of multicompartiment microcapsules for isolated co-encapsulation and controlled release of diverse components. *International Journal of Nonlinear Sciences and Numerical Simulation*. 2021;13(5):325–332. DOI: 10.1515/ijnsns-2012-0402.
- Beg S., Rahman M., Panda S. K., Alharbi K. S., Alruwaili N. K., Ameenuzzafar, Singh P. K., Thappa M., Singh B. Nasal mucoadhesive microspheres of lercanidipine with improved systemic bioavailability and antihypertensive activity. *Journal of Pharmaceutical Innovation*. 2021;16(2):237–246. DOI: 10.1007/s12247-020-09441-5.
- Gavini E., Rassa G., Sanna V., Cossu M., Giunchedi P. Mucoadhesive microspheres for nasal administration of an antiemetic drug, metoclopramide: in-vitro/ex-vivo studies. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2005;57(3):287–294. DOI: 10.1211/0022357055623.
- Lim S. T., Forbes B., Martin G. P., Brown M. B. In vivo and in vitro characterization of novel microparticulates based on hyaluronan and chitosan hydroglutamate. *AAPS PharmSciTech*. 2015;2:20. DOI: 10.1007/BF02830560.
- Varshosaz J., Sadrai H., Alinagari R. Nasal delivery of insulin using chitosan microspheres. *Journal of Microencapsulation*. 2004;21(7):761–774. DOI: 10.1080/02652040400015403.
- Jose S., Ansa C. R., Cinu T. A., Chacko A. J., Aleykutty N. A., Ferreira S. V., Souto E. B. Thermo-sensitive gels containing lorazepam microspheres for intranasal brain targeting. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013;441(1–2):516–526. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.10.049.

30. Gao Y., Almalki W. H., Afzal O., Panda S. K., Kazmi I., Alrobaian M., Katouah H. A., Altamimi A. S. A., Al-Abbasi F. A., Alshehri S., Soni K., Ibrahim I. A. A., Rahman M., Beg S. Systematic development of lectin conjugated microspheres for nose-to-brain delivery of rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;141:111829. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111829.
31. Sun Y., Shi K., Wan F., Cui F.-d. Methotrexate-loaded microspheres for nose to brain delivery: in vitro/in vivo evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2012;22(2):167–174. DOI: 10.1016/S1773-2247(12)50022-5.
32. Belgamwar V. S., Patel H. S., Joshi A. S., Agrawal A., Surana S. J., Tekade A. R. Design and development of nasal mucoadhesive microspheres containing tramadol HCl for CNS targeting. *Drug Delivery*. 2011;18(5):353–360. DOI: 10.3109/10717544.2011.557787.
33. Rassu G., Soddu E., Cossu M., Brundu A., Cerri G., Marchetti N., Ferraro L., Regan R.F., Giunchedi P., Gavini E., Dalpiaz A. Solid microparticles based on chitosan or methyl- $\beta$ -cyclodextrin: a first formulative approach to increase the nose-to-brain transport of deferoxamine mesylate. *Journal of Controlled Release*. 2015;201:68–77. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.01.025.
34. Dalmoro A., Sitenkov A. Y., Lamberti G., Barba A. A., Moustafine R. I. Ultrasonic atomization and polyelectrolyte complexation to produce gastroresistant shell-core microparticles. *Journal of Applied Polymer Science*. 2016;133:42976. DOI: 10.1002/app.42976.
35. Kaldybekov D. B., Tonglairoum P., Opanasopit P., Khutoryanskiy V. V. Mucoadhesive maleimide-functionalised liposomes for drug delivery to urinary bladder. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;111:83–90. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.09.039.
36. Phuong Ta L., Bujna E., Kun S., Charalampopoulos D., Khutoryanskiy V. V. Electrospayed mucoadhesive alginate-chitosan microcapsules for gastrointestinal delivery of probiotics. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;597:120342. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120342.
37. Porfiryeva N. N., Nasibullin S. F., Abdullina S. G., Tukhbattullina I. K., Moustafine R. I., Khutoryanskiy V. V. Acrylated Eudragit® EPO as a novel polymeric excipient with enhanced mucoadhesive properties for application in nasal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;562:241–248. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.03.027.
38. Brannigan R. P., Khutoryanskiy V. V. Synthesis and evaluation of mucoadhesive acryloyl-quaternized PDMAEMA nanogels for ocular drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017;155:538–543. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.04.050.
39. Porfiryeva N. N., Semina I. I., Salakhov I. A., Moustafine R. I., Khutoryanskiy V. V. Mucoadhesive and mucus-penetrating interpolyelectrolyte complexes for nose-to-brain drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2021;37:102432. DOI: 10.1016/j.nano.2021.102432.
40. Contin M., Martinelli P. Pharmacokinetics of levodopa. *Journal of Neurology*. 2010;257:253–261. DOI: 10.1007/s00415-010-5728-8.
41. Navaratnam P., Arcona S., Friedman H. S., Leoni M., Sasane R. Levodopa treatment patterns in Parkinson's disease: A retrospective chart review. *Clinical Parkinsonism & Related Disorders*. 2022;6:100135. DOI: 10.1016/j.prdoa.2022.100135.