



ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ СУБСТАНЦИИ СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ В ЛИПИДАХ УСТОЙЧИВЫХ НАНОЧАСТИЦ, СОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕКС БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МУСКУСА КАБАРГИ

С.Л. Люблинский¹, И.Н. Люблинская^{2*}, Е.М. Колоскова², А.М. Азизов²,
В.Н. Каркищенко¹, М.С. Нестеров¹, А.В. Капцов¹, Р.А. Агельдинов^{1,4}, В.Н. Герасимов³,
Д.В. Гриненко³

¹ ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

² ООО «Научно-производственная фирма «МОБИТЕК-М»»
249010, Российская Федерация, Калужская обл., Боровск, п. Институт, 6

³ ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
142279, Российская Федерация, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск

⁴ ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева»
125047, Российская Федерация, Москва, Миусская пл., 9

С целью сохранения и повышения биологической эффективности комплекса биологически активных веществ (БАВ), выделенных из мускуса кабарги, изучены технологические аспекты получения субстанции стабилизированных в липидах устойчивых наночастиц, содержащих комплекс БАВ, и выполнена оценка ее стабильности. Установлено, что оптимальным способом получения является гомогенизация под высоким давлением. Разработаны режимы приготовления липосомальной формы БАВ с заранее заданными параметрами дисперсности — средним диаметром частиц 250 ± 100 нм, индексом полидисперсности $0,3 \pm 0,1$ и дзета-потенциалом от -5 до -35 мВ. Установлено, что гомогенизатор высокого давления «Донор-5» позволяет получать липосомальные дисперсии со стандартными параметрами и степенью включения БАВ мускуса до 60%, а также обеспечивает минимальное окисление и гидролиз фосфолипидов (индекс окисленности 0,3). Исследования показали, что использование отечественного фосфатидилхолина является экономически оправданным и позволяет получать липосомальные формы надлежащего качества. Показатели качества полученной липосомальной субстанции охарактеризованы соответствующими методами анализа (динамическое светорассеяние, электронная микроскопия, гель-размерная хроматография, хромато-масс-спектрометрия и др.). На основании полученных результатов разработан проект спецификации на липосомальную субстанцию (порошок), содержащую комплекс БАВ, выделенных из мускуса кабарги. Разработанную технологию получения липосомальной формы БАВ из мускуса кабарги можно масштабировать в соответствии с требованиями GMP.

Ключевые слова: кабарга, мускус, липосомы, гомогенизатор высокого давления

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Люблинский С.Л., Люблинская И.Н., Колоскова Е.М., Азизов А.М., Каркищенко В.Н., Нестеров М.С., Капцов А.В., Агельдинов Р.А., Герасимов В.Н., Гриненко Д.В. Технологические аспекты получения субстанции стабилизированных в липидах устойчивых наночастиц, содержащих комплекс биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги. *Биомедицина*. 2021;17(4):18–37. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-4-18-37>

Поступила 20.08.2021

Принята после доработки 11.11.2021

Опубликована 10.12.2021

TECHNOLOGICAL ASPECTS OF OBTAINING LIPOSOMES CONTAINING A COMPLEX OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES ISOLATED FROM DEER MUSK

Stanislav L. Lyublinskiy¹, Irina N. Lyublinskaya^{2*}, Elena M. Koloskova², Arif M. Azizov², Vladislav N. Karkischenko², Maksim S. Nesterov¹, Alexander V. Kaptsov¹, Ruslan A. Ageldinov^{1,4}, Vladimir N. Gerasimov³, Dmitrii V. Grinenko³

¹ Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

² Scientific and Production Company "MOBITEK-M"
249010, Russian Federation, Kaluga Region, Borovsk, Institute Village, 6

³ State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
142279, Russian Federation, Moscow Region, Serpukhov District, Obolensk Settlement

⁴ Mendeleev University Chemical Technology of Russia
125047, Russian Federation, Moscow, Miusskaya Square, 9

In order to preserve and increase the biological effectiveness of biologically active substances isolated from deer musk, we studied technological aspects of obtaining a substance of lipid-stabilized stable nanoparticles from deer musk. The stability of the obtained substance was evaluated. It was found that homogenization under high pressure is an optimal approach to obtaining biologically active substances from deer musk. The modes of preparation of a liposomal form of biologically active substances with predetermined dispersion parameters (average particle diameter 250 ± 100 nm, polydispersity index 0.3 ± 0.1 , and zeta potential from -5 to -35 mV) were determined. It was found that the high-pressure homogenizer "Donor-5" makes it possible to obtain liposomal dispersions with standard parameters and the degree of inclusion of musk biologically active substances up to 60%, at the same time as providing minimal oxidation and hydrolysis of phospholipids (oxidation index 0.3). Our studies showed that the use of a domestic phosphatidylcholine is economically justified and allows obtaining liposomal forms of proper quality. The quality indicators of the obtained liposomal substance were characterised by conventional analytical methods (dynamic light scattering, electron microscopy, gel chromatography, chromatography-mass spectrometry, etc.). On the basis of the results obtained, a draft specification was developed for a liposomal substance (powder) containing a complex of biologically active substances isolated from deer musk. The developed technology for obtaining a liposomal form of biologically active substances from deer musk can be scaled up in accordance with GMP requirements.

Keywords: musk deer, musk, liposomes, high pressure homogenizer

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Lyublinskiy S.L., Lyublinskaya I.N., Koloskova E.M., Azizov A.M., Karkischenko V.N., Nesterov M.S., Kaptsov A.V., Ageldinov R.A., Gerasimov V.N., Grinenko D.V. Technological Aspects of Obtaining Liposomes Containing of a Complex of Biologically Active Substances Isolated from Deer Musk. *Journal Biomed.* 2021;17(4):18–37. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-4-18-37>

Submitted 20.08.2021

Revised 11.11.2021

Published 10.12.2021

Введение

Из пяти основных областей применения нанотехнологий в медицине и фармации в последние годы особенно интенсивно развиваются наноконтейнерные техноло-

гии доставки лекарств. Основной целью этих технологий является максимальное использование «фармацевтических факторов» для обеспечения высокого качества приготовляемых лекарственных средств,

что совпадает со стратегической задачей биофармации [11], которая заключается в максимальном повышении эффективности лекарственных средств и снижении до минимума возможного нежелательного их действия на организм.

Наибольшую популярность среди наноконтейнерных технологий завоевали технологии с применением липосом [1, 5, 17]. Благодаря своим физико-химическим свойствам, мембранотропности и биосовместимости липосомы в наибольшей степени соответствуют всем качествам, необходимым для эффективной доставки функциональных молекул к месту их действия. Поэтому из простой модели, имитирующей клеточные мембраны, липосомы превратились в объект активных научных исследований и практического применения.

На сегодняшний день известно более 100 липосомальных препаратов, как коммерчески доступных, так и проходящих различные стадии клинических исследований. Об особом интересе к разработке лекарств в липосомальной форме свидетельствуют данные реферативного сборника «Изобретения стран мира», где опубликовано более тысячи патентных документов, являющиеся результатом изучения этого вопроса.

Создание липосомальных форм имеет большое практическое значение для разработки новых органолекарств в качестве систем эффективной доставки различных биологически активных веществ (БАВ), полученных из природного сырья, в т.ч. из мускуса кабарги [18].

Липосомы, что в переводе с греческого означает «жировое тело», — это искусственно создаваемые липидные везикулы (пузырьки), состоящие из одного или нескольких фосфолипидных бислоев толщиной 4–20 нм, разделённых водной фазой. Впервые они были описаны в 1965 г. британским учёным А. Бэнгхемом и его коллегами.

Для практического применения липосом исключительно важно понимание их взаимодействия с мембраной клетки. Установлено, что липосома может увеличивать проницаемость мембраны, вызывая образование дополнительных каналов, проходящих через неё; может прикрепляться (адсорбироваться) к мембране; может поглощаться клеткой, и в этом случае вещество, принесённое ею, попадает непосредственно внутрь этой клетки; мембраны липосомы и клетки могут сливаться друг с другом; клеточная мембрана и липосома могут обмениваться липидами [15, 16]. Т.о., благодаря применению липосом появился новый способ направленного воздействия на клетку, который называют «мембранной инженерией» [19].

В настоящее время установлены основные критические точки и их параметры для процесса производства липосомальных препаратов (рис. 1), подлежащие тщательному контролю [4]. При разработке данных технологий необходимо учитывать многочисленные случаи, когда эффективные и безопасные липосомальные препараты, полученные в лабораторных условиях, не всегда удавалось воспроизвести в условиях промышленного производства. Это связано со множеством различных факторов: неоднородностью липидных компонентов, экспозицией биохимически важных функциональных групп на наружной поверхности липосом, фиксированной толщиной водного слоя, числом липидных бислоев и так далее, а также во многом зависит от используемого технологического оборудования и масштаба производства.

В настоящее время существует около 20-ти основных способов получения липосом [12, 20]. Для практического применения необходимо, чтобы разрабатываемые технологии позволяли сочетать стандартность состава и стабильность получаемых липосом, минимальное окисление и гидролиз фосфолипидов, сохранность вводимого

СТАДИИ ПРОИЗВОДСТВА ЛИПОСОМ

1. Субстанция липидов	2. Получение липосом	3. Стерилизующая фильтрация	4. Лиофилизация
<ul style="list-style-type: none"> - содержание основного вещества; - степень окисленности; - МБЧ; - температура фазового перехода; - тяжёлые металлы; - эндотоксины; - содержание лизоформ; - остаточные растворители 	<ul style="list-style-type: none"> - температура; - давление; - количество циклов; - степень включения АФС; - размер и заряд ЛС; - рН; - стабильность субстанций (ФЛ + АФС); - стабильность липосом; - содержание криопротектора 	<ul style="list-style-type: none"> - подбор материала; - скорость и давление; - температура; - объём и концентрация 	<ul style="list-style-type: none"> - параметры замораживания; - параметры сублимации; - тип и количество криопротектора; - выбор первичной упаковки; - содержание остаточной влажности; - условия герметизации и хранения; - стабильность; - условия регидратации

Рис. 1. Основные критические стадии процесса производства липосомальных препаратов и их параметры.

Fig. 1. Main stages in the production of liposomal preparations and their parameters.

лекарственного препарата с высокой производительностью и простотой способа их получения. Существенное значение имеет наличие стандартного промышленного оборудования и получение препарата в асептических условиях в закрытом режиме, а также возможность регулирования и контроля основных параметров в ходе технологического процесса валидации.

Поскольку мускус кабарги представляет собой сложнейший комплекс, состоящий не только из белков, пептидов, простых и сложных липидов, стероидов, восков, ароматических соединений, сложных эфиров холестерина, но и включает в себя целые клетки, кусочки тканей, шерстинки, песчинки и др. посторонние примеси, многие способы липосомирования для этого биологического объекта не применимы. Поэтому для получения липосом, содержащих БАВ из мускуса, из существующих на сегодняшний день технологий был выбран, как наиболее перспективный, способ гомогенизации под высоким давлением.

Выбор этого метода для получения липосом определяется его высоким гомогенизирующим эффектом, возможностью максимально сохранить биологическую активность липосомлируемых компонентов, скоростью и производительностью процесса липосомирования, а также возможно-

стью масштабирования технологии в дальнейшем.

Необходимость создания отечественных устройств для приготовления специализированных гомогенных высокодисперсных эмульсий и липосомальных дисперсий медико-биологического назначения была обусловлена возрастающей потребностью в них в медицине, фармакологии и биотехнологии в последние десятилетия прошлого века. Одним из основных разработчиков данного оборудования был талантливый изобретатель Капцов В.В. (Институт биохимии клетки РАН, г. Пущино). С помощью созданного им гомогенизатора высокого давления (ГВД) «Донор» [7, 21] в этом институте впервые в мире был разработан искусственный кровезаменитель с газотранспортной функцией «Перфторан».

Дисперсность, или размер липосом в значительной степени влияет на скорость элиминации и характер распределения лекарственных веществ в организме, их концентрацию в биологических жидкостях и тканях. Эти показатели являются важным параметром, который определяет механизм интернализации клеток [14]. Показано, что частицы диаметром менее 200 нм вводятся в клетки с помощью клатрин-опосредованного эндоцитоза, а частицы размером 200–500 нм поступают через кавеоло-опосредованный эндоцитоз [24]. Установлено,

что частицы диаметром более 200 нм могут активировать систему комплемента в организме человека и удаляться из кровотока купферовскими клетками. Кроме того, во время фильтрации в селезёнке захватываются частицы, размер которых превышает 200–250 нм, а во время печёночной фильтрации задерживаются частицы диаметром более 150 нм.

Таким образом, липосомы меньшего диаметра имеют преимущество перед липосомами больших размеров, поскольку они могут избегать фагоцитоза клетками ретикулоэндотелиальной системы и способны легко проникать в межклеточное пространство. Однако необходимо учитывать, что частицы размером менее 100 нм имеют высокую тенденцию к образованию кластеров и агрегатов, которые в дальнейшем могут привести к эмболизации и вызывать инсульты, инфаркты миокарда и др. осложнения.

Субстанцию липосом, содержащую БАВ из мускуса кабарги, планируется применять для производства пероральных препаратов трансмукозального введения. Известно, что в этом случае БАВ попадают непосредственно в большой круг кровообращения в обход желудочно-кишечного тракта и минуя метаболизм первого прохода в печени. Их абсорбция осуществляется посредством пассивной диффузии через мембраны и по скорости в единицу времени превышает пероральный приём в 3–10 раз, уступая только подкожным инъекциям. Это позволяет использовать меньшее количество действующего вещества при одной и той же биодоступности или увеличивать эффективную действующую концентрацию. В связи с этим в ходе работы планировалось добиться оптимального размера основной фракции липосом в экспериментальных образцах субстанции в диапазоне 250 ± 100 нм.

Целью настоящей работы являлась разработка технологии получения стабилизи-

рованных в липидах устойчивых наночастиц, содержащих комплекс биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги, с помощью гомогенизации при высоком давлении.

Материалы и методы

Для получения липосом в ходе эксперимента в качестве сырья были использованы 70% фосфатидилхолин (производство «АЛМ», Россия) и 80% фосфатидилхолин (производство «Липоид», Германия), а также концентрат БАВ из мускуса кабарги (ТУ 01.49.24-001-58709973-2017).

Получение липосом осуществляли с помощью отечественного гомогенизатора высокого давления в последней модификации «Донор-5» (рис. 2). Перед началом гомогенизации диспергируемые компоненты приготавливаемого продукта после предварительного перемешивания в механическом смесителе заливаются в расходную ёмкость. Из неё они поступают в экстразионную камеру (гомогенизирующее устройство), в которой они продавливаются через микрощель из области высокого давления (от 40 до 1000 МПа) в область нормального атмосферного давления.

Процессы диспергирования, гомогенизации или дезинтеграции осуществляются за счет резкого падения давления и действия гидродинамических сил турбулентного потока, возникающих в области микрощели. Капли или частицы, испытывая усилия растягивания и среза, дробятся на части. Величина давления характеризует степень этих усилий и служит основным технологическим показателем трудоемкости процесса. Процесс повторяется несколько раз до достижения необходимого качества продукта, в т. ч. величины липосом.

По своим технологическим параметрам гомогенизатор «Донор-5» превосходит все серийно выпускаемые отечественные и зарубежные аналоги. К его основным преимуществам относятся:



Рис. 2. Внешний вид гомогенизатора высокого давления «Донор-5». Fig. 2. External view of the high-pressure homogenizer "Donor-5".

- высокая степень разрушения клеток и тканей;
- высокая дисперсность конечных продуктов и широкий диапазон величины частиц (от 10 нм до 10 мкм);
- высокая производительность (до 25–30 л/ч), возможность приготовления малых порций продукта (100–200 мл), а также независимого приготовления двух продуктов одновременно;
- отсутствие окисляющего действия на компоненты продуктов;
- быстросъемность и автоклавируемость гомогенизирующих узлов (головок), обеспечение стерильного получения конечных продуктов;
- отсутствие загрязнения продукта механическими примесями;

- широкий диапазон регулирования давления, температуры и производительности;
- визуализация основных параметров технологического процесса и возможность его валидации;
- соответствие нормам GMP;
- небольшие габариты и масса.

Изучение подлинности (наличия липосом) проводили в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (г. Оболенск) методом негативного контрастирования в трансмиссионном электронном микроскопе Tescan G2 Spirit bioTWIN (фирма «FEI», США) при ускоряющем напряжении 120 кВт и увеличениях от 5000 до 80000 крат. Электронно-микроскопические изображения полей каждого образца, усеянных

липосомами, фотографировали с разных участков (25–30 участков) экрана микроскопа с помощью программы FEI Digital Micrograph, выбирая при этом всегда случайные поля. Полученные изображения липосом были проанализированы и обработаны с помощью программного обеспечения Tecnai Imaging & Analysis (фирма «FEI», США).

Для определения размера липосом, индекса полидисперсности и дзета-потенциала использовался метод динамического рассеяния света (ДРС) с помощью лазерного корреляционного спектрометра Photocor Compact-Z с применением программного обеспечения Photocor Software [26].

Индекс окисленности липидов в составе липосом определялся фотометрическим методом при 232 нм [2]. Определение общего белка проводили по методу Бредфорда без предварительного осаждения белка в соответствии с ГФ РФ, ЦФС. 1.2.3.0012.15 «Определение белка».

Количественное определение БАВ из мускуса кабарги и процент их включения в липосомы проводилось методами, разработанными ФМБА России [8].

Молекулярно-массовое распределение липосомальной дисперсии оценивали методом гель-размерной хроматографии (ГРХ) высокого разрешения на жидкостном ионообменном хроматографе среднего давления NGC Discovery («Bio-Rad», США). Степень включения БАВ из мускуса кабарги в липосомы определяли методом хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения ВЭЖХ–МС ВР 1290 QTOF 6545 XT («Agilent Technologies», США) для фракций, собранных после гель-размерной хроматографии. Маркерными компонентами включения выбраны стероидная фракция, холестерин и общий белок.

Результаты и их обсуждение

При разработке технологии получения липосом, содержащих БАВ из мускуса

кабарги, учитывались доступные отечественные и зарубежные информационные материалы, собственный практический опыт, а также технологические принципы получения липосомальных лекарственных препаратов в условиях GMP [13].

В ходе эксперимента предварительно подготовленные 10% водные р-ры фосфолипидов и БАВ из мускуса кабарги в соотношении 5:1 подвергали гомогенизации. Получение липосом на гомогенизаторе высокого давления производили в течение 9-ти циклов по 3–5 мин каждый при температуре 33 ± 3 °С, с постепенным повышением давления от 20 до 90 МПа. В процессе гомогенизации постоянно контролировался гидродинамический диаметр образующихся липосом. Его определение проводилось с помощью анализатора размера частиц «Photocor Mini» методом лазерной дифракции света (638 нм).

Указанный параметр определяли после проведения каждого цикла, следя за тем, чтобы диаметр липосом уменьшался с каждым циклом. Это позволяет оперативно выявить нарушения регламентируемых параметров процесса: температуры, значения pH, ионной силы, давления и др. При достижении частицами среднего размера 250 ± 100 нм гомогенизацию завершали. В липосомальную дисперсию добавляли криопротектор и высушивали с помощью лиофилизации.

Для лучшего понимания процесса получения липосом следует отметить, что дисперсными системами являются гетерогенные системы из двух или большего числа фаз с сильно развитой поверхностью раздела между ними. Обычно одна из фаз образует непрерывную дисперсионную среду (в нашем случае это водно-солевой буферный р-р), в объёме которой распределена дисперсная фаза (или несколько дисперсных фаз) в виде мелких кристаллов, твёрдых аморфных частиц, капель или пузырьков (в т. ч. липосом).

В грубодисперсных системах частицы имеют размеры от 1 мкм и выше (удельная поверхность — не более $1 \text{ м}^2/\text{г}$), а в тонко- (высоко-) дисперсных, или коллоидно-дисперсных, системах — от 1 нм до 1 мкм (удельная поверхность достигает сотен $\text{м}^2/\text{г}$) [6].

Нередко в научной литературе встречаются выражения «суспензия липосом», «липосомальная эмульсия», что применительно к сложной структуре липосом не совсем верно. Так, согласно ГФ XIII, суспензия представляет собой гетерогенную дисперсионную систему, содержащую одно или несколько твёрдых действующих веществ, распределённых в жидкой дисперсионной среде, а эмульсия — гетерогенную двухфазную дисперсную систему с жидкой дисперсной фазой и жидкой дисперсионной средой. Липосомы являются одной из разновидностей коллоидно-дисперсных систем, а именно липосомальной дисперсией.

Помимо структуры, липосомальную дисперсию от обычных крупнодисперсных жировых эмульсий отличают меньшие размеры частиц, меньшая вязкость, огромная суммарная площадь контакта со средой, большая устойчивость (т.е. не требуется введение стабилизатора-эмульгатора), от наноэмульсий — состав, а от грубых, быстро оседающих суспензий с низкой кинетической устойчивостью — условия высокодисперсности.

На стадии разработки и получения липосомальной лекарственной формы (ЛФ) очень важна характеристика и оценка агрегативной и кинетической (седиментационной) устойчивости (стабильности) полученного продукта [3]. Различная диспергируемость частиц мускуса при одинаковых условиях измельчения определяется их структурой, механической прочностью и механизмом диспергирования в различных экстрагирующих буферных растворах. Этот процесс чрезвычайно важен не только для полноты извлечения био-

логически активных компонентов, но и для проведения при необходимости дальнейшего их выделения и очистки.

Таким образом, одним из основных показателей, определяющим подбор технологического оборудования для дальнейшего производственного процесса получения липосом и последующую биологическую активность фармацевтической субстанции на основе мускуса кабарги, является степень дисперсности получаемой суспензии (средний размер частиц и их распределение по размерам).

Несомненную практическую значимость на стадии разработки и получения липосомальной ЛФ представляет характеристика и оценка устойчивости полученного продукта по трём основным показателям — размеру везикул, индексу полидисперсности и дзета-потенциалу [22, 23, 25, 27].

Размер липосом применяется как основной показатель качества, определяющий стабильность производимой субстанции и её биодоступность. Это обусловлено тем, что изменение дисперсности влияет на агрегатное состояние дисперсной фазы. Необходимо отметить естественное стремление липосом к формированию более крупных структур (конъюгатов, агломератов и т.п.). К этому их принуждают силы поверхностной активности, не уравновешенные внутренним состоянием атомарно-молекулярного взаимодействия.

Размер частиц зависит от двух основных факторов — компонентного состава (концентрации и свойств активного и вспомогательных веществ) и технологии получения. На размер липосом влияет также концентрация и соотношение твёрдых и жидких липидов. Отмечено, что увеличение общей концентрации липидов, а также доли твердых липидов в составе относительно жидких способствует увеличению размера липосом.

Пример отображения экспериментальных данных о количественном распределе-

нии размеров липосом, полученных с помощью анализатора «Photocog», приведён на рис. 3 и 4. В липосомальной дисперсии мускуса кабарги, на основе 70% и 80% фосфатидилхолина, 95,9% составляют частицы с размером 131 ± 30 нм и 92,7% соответственно 120 ± 28 нм. Сравнение результатов свидетельствует о том, что применение отечественного фосфатидилхолина позволяет получать липосомы необходимого качества.

Результаты исследования восстановленных образцов сублимированных липосом (табл. 1) подтверждают, что размеры частиц после повторного растворения в воде не изменяются.

В большинстве наномолекулярных и нанодисперсных систем молекулы и частицы неодинаковы. При описании свойств систем необходимо использовать функции распределения частиц по их параметрам, т.е. при исследовании реальных систем учитывать их полидисперсность, т.к. монодисперсные приближения могут приводить к неверным заключениям о свойствах частиц. Ширину распределения частиц по размерам характеризуют по индексу полидисперсности (polydispersity index — PDI).

Значения PDI ранжируются от нуля до единицы. Чем ближе значение PDI к нулю, тем частицы более гомогенные. Как и размер частиц, значение PDI зависит от состава продукта и способа получения липосом и является очень чувствительным к присутствию агрегатов или загрязнений (пыли, инородных объектов). Ожидаемое значение PDI для монодисперсных образцов не должно превышать 0,5.

Экспериментальные данные, полученные с помощью анализатора «Photocog» и приведённые в табл. 1, показывают, что этот параметр в экспериментальных образцах липосомальной субстанции соответствует установленной норме.

Дзета (Z)-потенциал — один из основных параметров, влияющих на стабильность

дисперсных систем. Он является важнейшим индикатором поверхностного заряда липосом и мерой электростатического взаимодействия (отталкивания или притяжения) между частицами. Согласно физической теории устойчивости коллоидных систем ДЛФО (теория Дерягина, Ландау, Фервея и Овербека), стабильность коллоидных систем определяется двойным электрическим слоем (т.н. «энергетическим барьером») и образованием ван-дер-ваальсовых сил, которые обуславливают приближение частиц друг к другу. Если этот энергетический барьер, представленный силами отталкивания, будет преодолен за счёт сил Ван-дер-Ваальса, частицы будут взаимодействовать друг с другом и слипаться, что является нежелательным для липосомальных систем доставки различных ЛВ. Кроме того, измерение дзета-потенциала — одна из возможностей сокращения периода проверки стабильности липосомальных ЛВ за счёт уменьшения длительности и затрат на тестирование и увеличение срока хранения.

Экспериментальные данные, полученные с помощью анализатора «Photocog» и приведённые в табл. 1, показывают, что дзета-потенциал в образцах липосомальной субстанции соответствует установленной норме.

Свойства липосом во многом определяются жирнокислотным составом и химическим состоянием липидов, входящих в их состав. Основным деструктивным процессом в липидах является окисление, поэтому они должны быть минимально окислены по двойным связям. Обнаружено, что в процессе хранения липосомального препарата pH среды в контроле снижается. Это объясняется тем, что в процессе окисления липидов наблюдается возрастание концентрации карбоновых кислот, детектирование которых проводят фотометрически. Существуют экспериментально подтвержденные рекомендации о том, что для по-

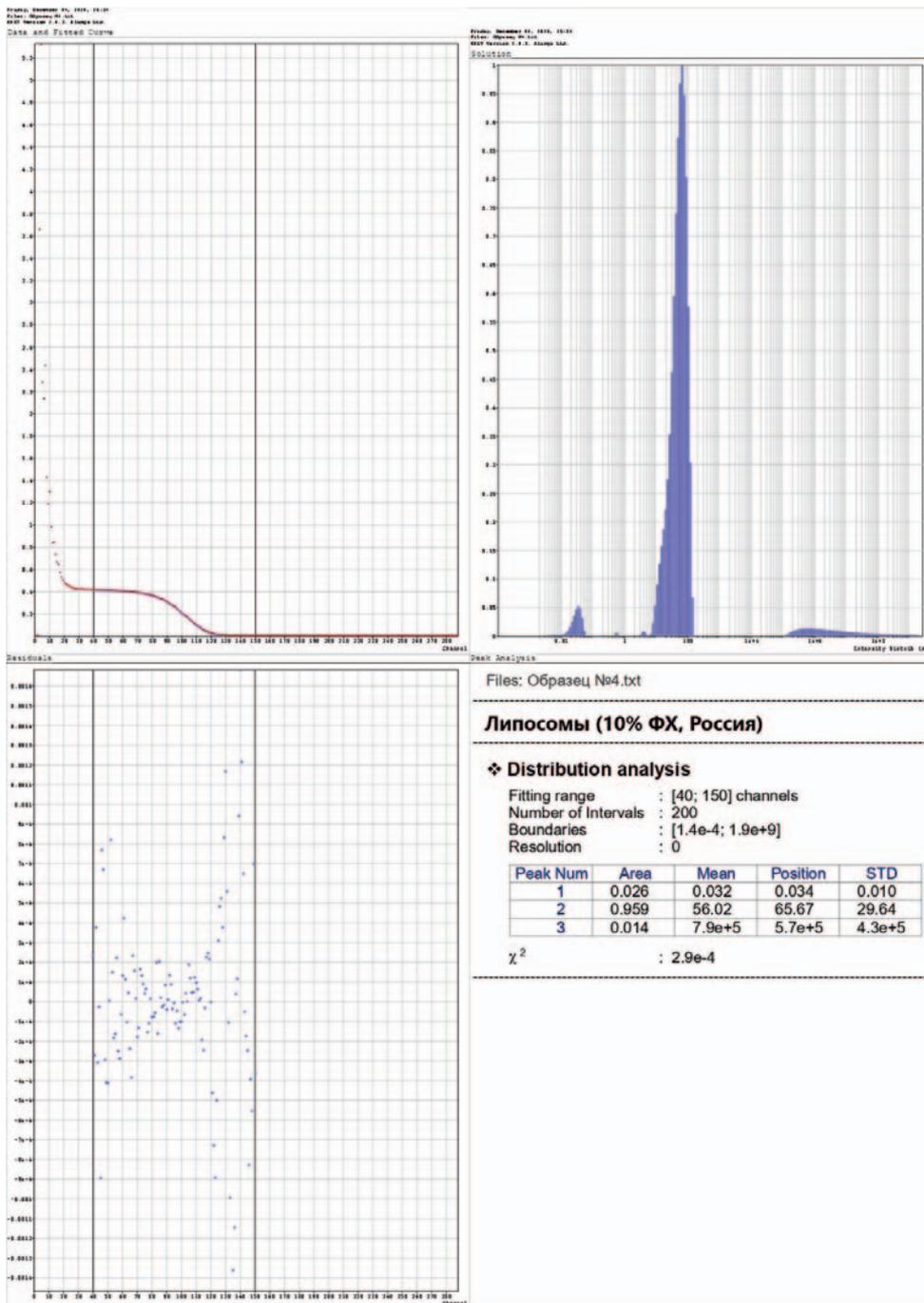


Рис. 3. Среднее интегральное значение размера частиц 10% исходного р-ра липосом мускуса кабарги, полученных на основе 70% фосфатидилхолина (Россия).
Fig. 3. Mean integral value of the particle size of a 10% precursor solution of musk liposomes obtained on the basis of 70% phosphatidylcholine (Russia).

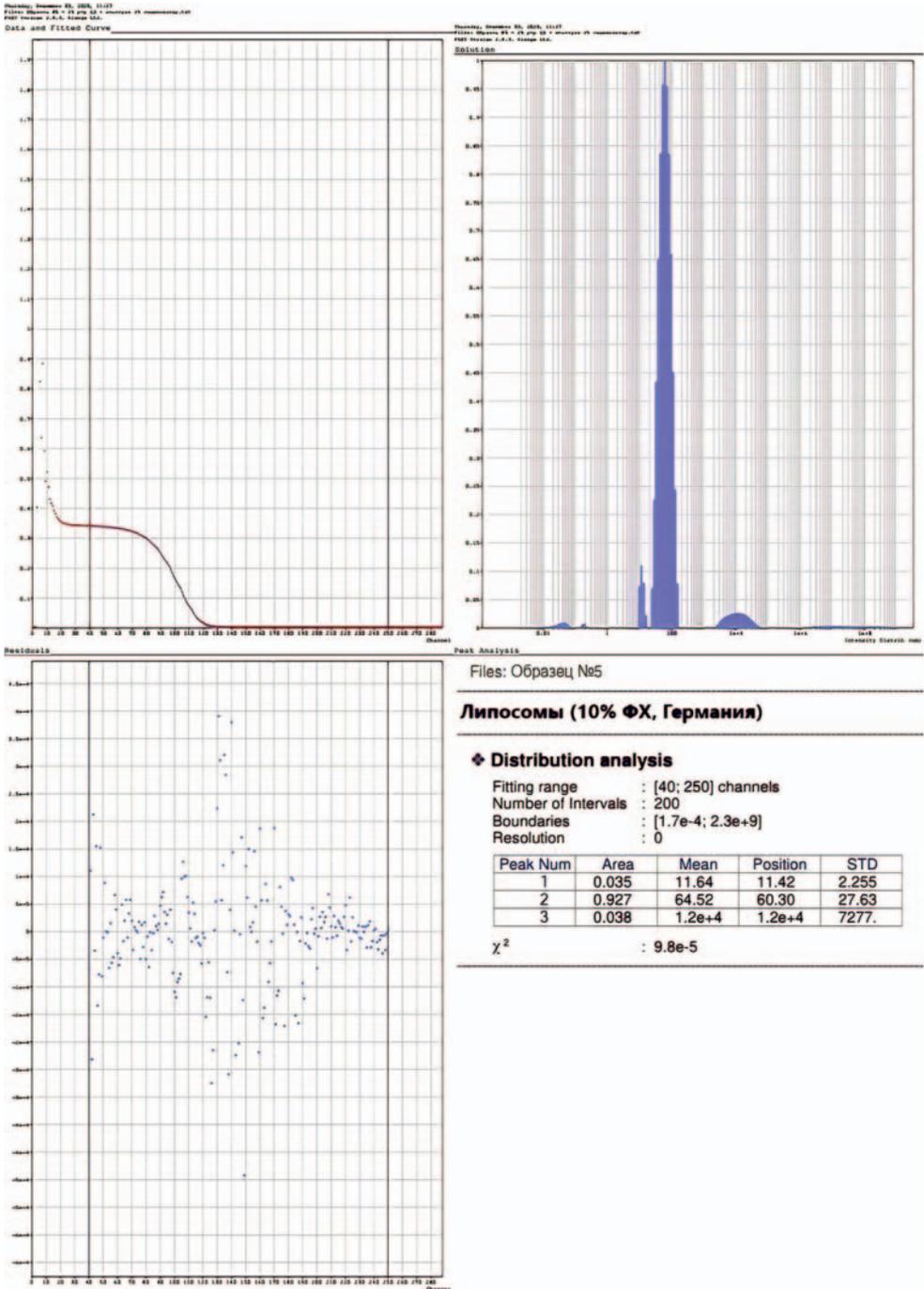


Рис. 4. Среднее интегральное значение размера частиц 10% исходного р-ра липосом мускуса кабарги, полученных на основе 80% фосфатидилхолина (Германия).
Fig. 4. Mean integral value of the particle size of a 10% precursor solution of musk liposomes obtained on the basis of 80% phosphatidylcholine (Germany).

Таблица 1. Размер, вариабельность и дзета-потенциал частиц в восстановленных образцах липосомальной субстанции мускуса

Table 1. Particle size, variability, and zeta potential in reduced musk liposomal substance samples

Показатели	Норма	Образец № 1	Образец № 2
Размер частиц, нм	250±100	175 (75%)	240 (65%)
Индекс полидисперсности	менее 0,5	0,33	0,32
Дзета-потенциал, мВ	-5...-35	-25	-33
Индекс окисленности	не более 0,5	0,31	0,34

лучения липосом необходимо применять фосфолипидное сырье с индексом окисленности не выше 0,5. С целью предотвращения и замедления процессов окисления не только фосфолипидов бислоя липосом, но и большого числа различных БАВ липидной природы, содержащихся в мускусе кабарги, в состав липосом были добавлены антиоксиданты (антиокислители и ингибиторы окисления).

При отработке получения липосом методом гомогенизации под высоким давлением было установлено (табл. 1), что индексы окисленности экспериментальных образцов отличаются незначительно (от 0,28 до 0,34) и соответствуют заданному параметру.

На этапе первичной оценки липосомальной формы необходимо удостовериться, что в её составе действительно присутствуют липосомы. Основным методом определения присутствия липосом и морфологии их поверхности является электронная ми-

кроскопия, которая одновременно предоставляет информацию о форме, структуре и размере липосом.

На рис. 5 приведен снимок, полученный с помощью электронной микроскопии, на котором хорошо видны микронных размеров частицы исходного концентрата мускуса до его гомогенизации и липосомирования.

Исследования в электронном микроскопе структуры дисперсии липосом, содержащих БАВ мускуса, до лиофильной сушки показали, что липосомы в образце представляют собой везикулы регулярной округлой, овальной и очень редко каплевидной формы диаметром от 50 до 1000 нм (рис. 6). При этом липосомы диаметром от 50 до 200 нм составляют около 60% от всех липосомальных частиц в образце (рис. 7).

Во внутренней структуре липосом видны мелкие образования нерегулярной формы с разной электронно-оптической плотно-

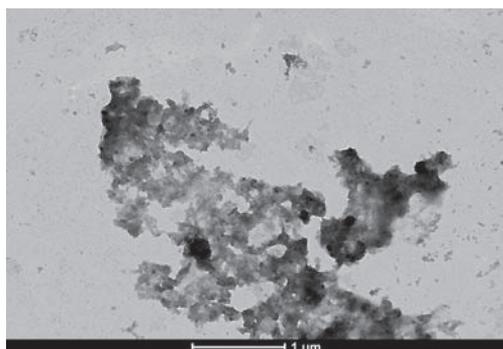


Рис. 5. Микрофотография частиц исходного концентрата мускуса кабарги.

Fig. 5. Micrograph of particles of the precursor deer musk concentrate.

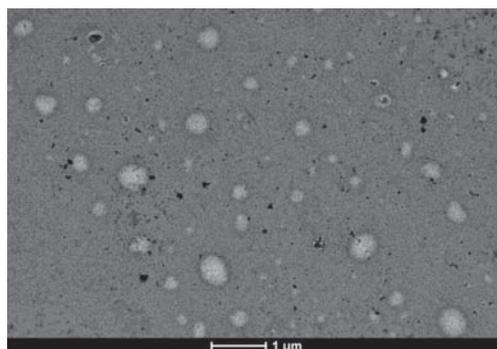


Рис. 6. Микрофотография липосом в исходной липосомальной дисперсии.

Fig. 6. Micrograph of liposomes in the precursor liposomal dispersion.

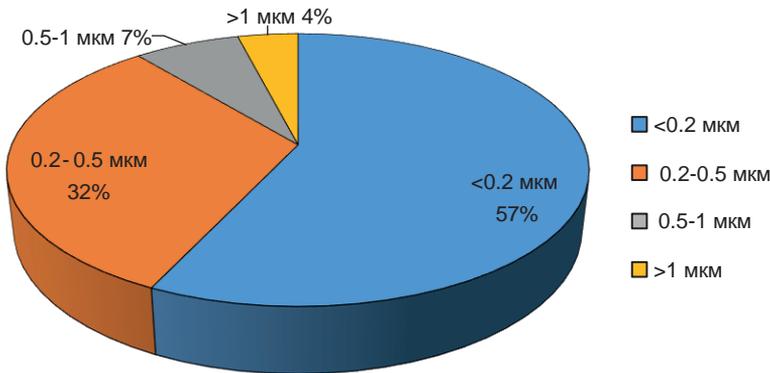


Рис. 7. Распределение частиц в исходной липосомальной дисперсии.
Fig. 7. Particle distribution in the precursor liposomal dispersion.

стью диаметром 5–20 нм — по всей вероятности, частицы БАВ мускуса.

На микрофотографиях (рис. 6 и 8) представлены данные о морфологии и гидродинамическом диаметре (размере) частиц двух восстановленных в воде липосомальных образцов мускуса, полученных при помощи гомогенизации под высоким давлением. На них чётко видны отдельные монослойные липосомы сферической формы. Липосомы размером от 100 до 300 нм хорошо окрашены гидрофильными (внутренний объем везикул) и гидрофобными (пространство внутри бислоя везикул, образованного фосфолипидами) компонентами, входящими в состав мускуса кабарги. Диаграммы распределе-

ния частиц по размерам (рис. 7 и 9) также показывают, что основная фракция липосом представлена частицами с диаметром около 200 нм. Важно подчеркнуть, что эти данные хорошо коррелируют с результатами, полученными с помощью анализатора размеров частиц (табл. 2).

Изображения на рис. 8 и 10 свидетельствуют, что липосомальная форма субстанции сохраняется и после восстановления лиофилизированного порошка липосом мускуса.

Необходимо отметить, что возможны основные четыре пути включения БАВ в липосомы: водорастворимые вещества включаются во внутренний водный объём, в гидрофобную область бислоя, адсорбируются на поверхности либо химически связываются с компонентами бислоя. Возможна также комбинация способов включения, особенно для БАВ из мускуса, который содержит огромный спектр органических соединений гидрофильной и гидрофобной природы.

В составе мускуса можно выделить три группы соединений с наиболее выраженным биологическим эффектом: стероидные компоненты, жирные кислоты, пептиды и белки [8, 9, 10]. Поэтому продолжение исследований по разработке методов количественной оценки включения основных

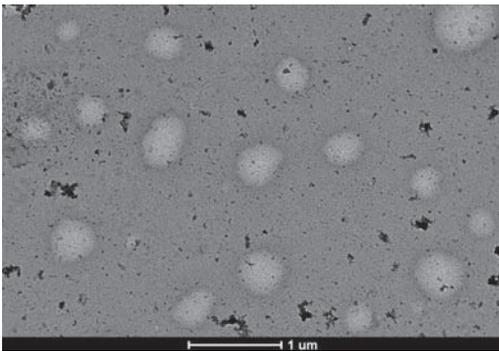


Рис. 8. Микрофотография восстановленных липосом (образец № 1).

Fig. 8. Micrograph of reduced liposomes (sample No. 1).

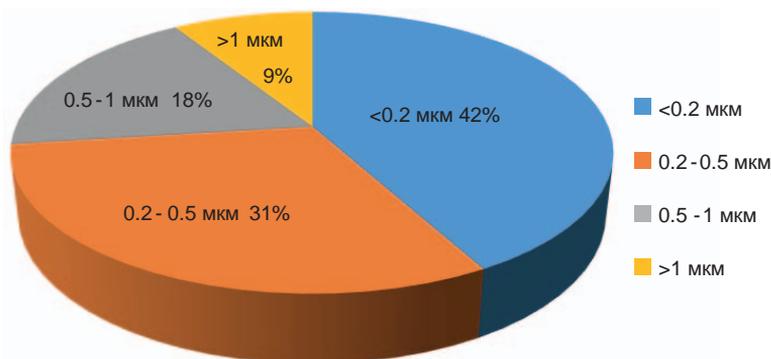


Рис. 9. Распределение частиц по размерам в р-ре восстановленных липосом (образец № 1).
Fig. 9. Particle size distribution in a solution of reduced liposomes (sample No. 1).

фармацевтически активных компонентов мускуса в липосомы является актуальным.

Изучение основных параметров, характеризующих качество липосомальной субстанции (подлинность, процент включения БАВ и их количественное определение), проведенное в ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» (табл. 2), свидетельствует о том, что более 60% БАВ из мускуса кабарги включается в липосомы.

На основании вышеизложенных литературных данных, результатов собственных исследований (рис. 11–13), а также «Требований к показателям качества и исследованию лекарственных средств на основе липосом, мицелл и лекарственных средств, содержащих покрытие из наночастиц» разработан проект спецификации

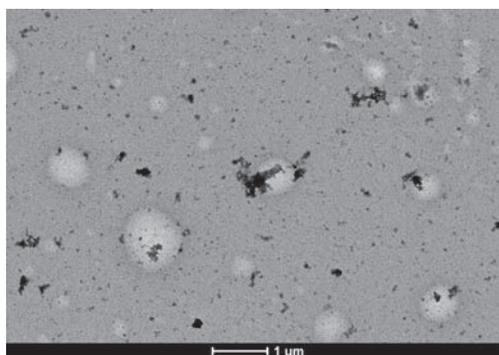


Рис. 10. Микрофотография восстановленных липосом (образец № 2).

Fig. 10. Micrograph of reduced liposomes (sample No. 2).

(табл. 2) на липосомальную субстанцию (порошок), содержащую комплекс БАВ, выделенных из мускуса кабарги (рис. 14).

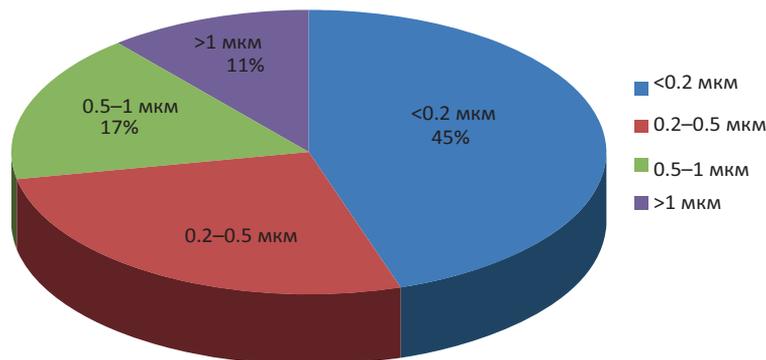


Рис. 11. Распределение частиц по размерам в растворе восстановленных липосом (образец № 2).

Fig. 11. Particle size distribution in a solution of reduced liposomes (sample No. 2).

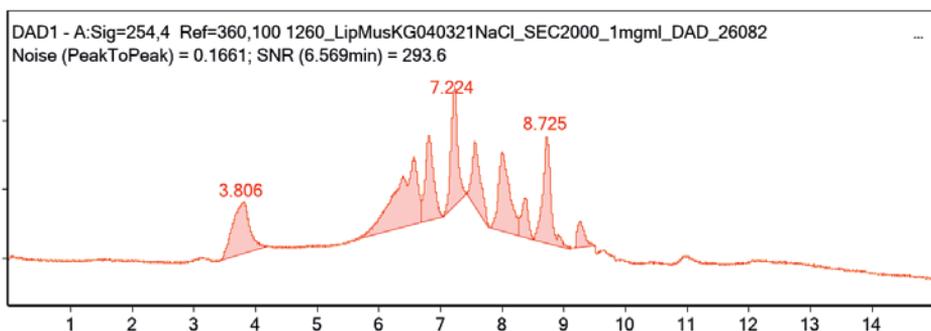


Рис. 12. Препаративная гель-размерная хроматограмма р-ра липосом мускуса кабарги.
Fig. 12. Preparative gel-size chromatogram of the deer musk liposome solution under study.

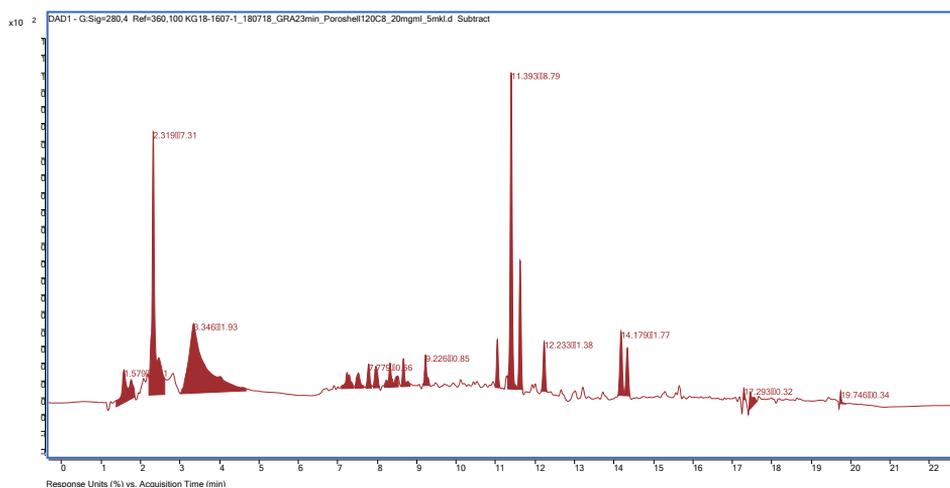


Рис. 13. Типичная ВЭЖХ-УФ хроматограмма компонентов БАВ липосом мускуса кабарги.
Fig. 13. Typical HPLC-UV chromatogram of biologically active substances of deer musk liposomes.



Рис. 14. Экспериментальный образец липосомированной субстанции мускуса.
Fig. 14. Experimental sample of the liposomal musk substance under study.

Таблица 2. Проект спецификации на липосомальную субстанцию (порошок), содержащую комплекс БАВ, выделенных из мускуса кабарги

Table 2. Draft specification for a liposomal substance (powder) containing a complex of biologically active substances isolated from musk of musk deer

Показатель	Метод	Норма
Описание	Органолептический ГФ XIII, ОФС 1.1.0006.15, ч. 1	Лиофилизированный аморфный порошок светлорыжевого цвета с характерным запахом и вкусом мускуса
Растворимость	ГФ РФ XIII, ОФС 1.2.1.0005.15, ч. 1, с. 531	Мало растворим в воде, мало растворим в спирте 96%, практически не растворим в гексане
Подлинность: - присутствие липосом; - наличие БАВ мускуса	Электронная микроскопия (метод негативного контрастирования) ГХ–МС (ГХ–ПИД) ВЭЖХ–УФ	Моноамеллярные липосомы сферической формы Время удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого р-ра должно соответствовать времени удерживания основных пиков на хроматограмме стандартного образца липосом мускуса кабарги Время удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого р-ра должно соответствовать времени удерживания основных пиков на хроматограмме стандартного образца липосом мускуса кабарги
Размер частиц	ГФ XII, ч. 2 Фотодинамическое и лазерное светорассеяние	50–500 нм
Индекс полидисперсности	Фотодинамическое и лазерное светорассеяние	0,5±0,1
Дзета-потенциал	Динамическое светорассеяние	– 5...–35 мВ
Степень включения БАВ мускуса	Гель-хроматография ВЭЖХ–МС	Не менее 50% Не менее 50%
Индекс окисленности	Спектрофотометрия	Не более 0,5
рН	ГФ РФ, ОФС 1.1.0006.15 (потенциметрический метод)	От 6,0 до 8,0 (1% р-р)
Вода	ГФ РФ, ОФС 1.2.3.0002.15	Не более 5,0%
Общий белок	ГФ РФ, ОФС. 1.2.3.0012.15 Метод Бредфорд (колориметрический)	Не более 4%
Сульфатная зола	ГФ РФ, ОФС 1.2.2.2.0014.15	Не более 5,0%
Тяжелые металлы	ГФ РФ, ОФС 1.2.2.2.0012.15	Не более 0,002%
Остаточные органические растворители	ГХ РФ	Этанол — не более 0,5%; изопропилового спирта — не более 0,5%
Микробиологическая чистота	ГФ РФ, ОФС. 1.2.4.0002.15	Категория 3.2
Количественное определение	ВЭЖХ	Не менее 90,0% и не более 110,0% в пересчете на безводное вещество
Хранение	В сухом защищенном от света месте при температуре не выше 20 °С	
Срок годности	Устанавливается	

Выводы

1. Гомогенизация под высоким давлением является оптимальным способом получения стабилизированных в липидах устойчивых наночастиц, содержащих комплекс БАВ, выделенных из мускуса кабарги.

2. На основании проведённых исследований разработаны режимы приготовления липосомальной формы БАВ с заранее заданными параметрами дисперсности (средним диаметром частиц 250 ± 100 нм, индексом полидисперсности $0,3 \pm 0,1$ и дзета-потенциалом от -5 до -35 мВ).

3. Гомогенизатор высокого давления «Донор-5» позволяет получать липосомальные дисперсии со стандартными параметрами и степенью включения БАВ

мускуса до 60%, а также обеспечивает минимальное окисление и гидролиз фосфолипидов (индекс окисленности 0,3).

4. На основании полученных результатов разработан проект спецификации на липосомальную субстанцию (порошок), содержащую комплекс БАВ, выделенных из мускуса кабарги.

5. Использование отечественного фосфатидилхолина является экономически оправданным и позволяет получать липосомальные формы надлежащего качества.

6. Разработанную технологию получения липосомальной формы БАВ из мускуса кабарги можно масштабировать в соответствии с требованиями GMP.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Баллюзек Ф.К., Куркаев А.С., Сенте Л. *Нанотехнологии для медицины*. СПб.: Сесам-Принт, 2008:104. [Ballyuzek F.K., Kurkayev A.S., Sente L. *Nanotekhnologii dlya meditsiny* [Nanotechnology for medicine]. Saint-Petersburg: Sesam-Print Publ., 2018:104. (In Russian)].
2. Борщевский Г.И. Определение индекса окисленности липосомальных наночастиц. *Химия и химические технологии*. 2015;9:25–26. [Borshchevskiy G.I. Opredeleniye indeksa okislennosti liposomal'nykh nanoplastits [Determination of the oxidation index of liposomal nanoparticles]. *Khimiya i khimicheskiye tekhnologii* [Chemistry and chemical technologies]. 2015;9:25–26. (In Russian)].
3. Борщевський Г.І., Комаров І.В., Кулініч А.В. Фактори, які впливають на стабільність препарату Лесфаль. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2013;6:10–14. [Borshchev's'kiy G.I., Komarov I.V., Kulinich A.V. Faktory, yaki vplyvayut' na stabil'nist' preparatu Lesfal' [Factors affecting the stability of the drug Lesfal]. *Upravlinnya, ekonomika ta zabezpechennya yakosti v farmatsiyi* [Management, economics and quality assurance in pharmacy journal]. 2013;6:10–14. (In Ukrainian)].
4. Быковский С.Н., Василенко И.А., Демина Н.Б., Шохин И.Е., Новожилов О.В., Мешковский А.П., Спицкий О.Р. *Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. Научно-практ. рук-во для фармацевтической отрасли*. М.: Перо, 2015:472. [Bykovskiy S.N., Vasilenko I.A., Demina N.B., Shokhin I.Ye., Novozhilov O.V., Meshkovskiy A.P., Spitskiy O.R. *Farmatsevticheskaya razrabotka: kontseptsiya i prakticheskiye rekomendatsii. Nauchno-prakt. ruk-vo dlya farmatsevticheskoy otrasli* [Pharmaceutical Development: Concept and Practical Guidelines. Scientific and practical guide for the pharmaceutical industry]. Moscow: Pero Publ., 2015:472. (In Russian)].
5. Грегориадис Г., Аллисон А. *Липосомы в биологических системах*. М.: Медицина, 1983:384. [Gregoriadis G., Allison A. *Liposomy v biologicheskikh sistemakh* [Liposomes in biological systems]. Moscow: Medicine Publ., 1983:384. (In Russian)].
6. Зефирова Н.С., Кнунянц И.Л., Кулов Н.Н. *Химическая энциклопедия*. М.: Советская энциклопедия. 1990:80–82. [Zefirova N.S., Knunyants I.L., Kulov N.N. *Khimicheskaya entsiklopediya* [Chemical encyclopedia]. Moscow: Soviet encyclopedia Publ., 1990:80–82. (In Russian)].
7. Капцов В.В., Алымов А.В., Шибаяев Н.В., Кукушкин В.И., Маевский Е.И. Выбор способов и устройств диспергирования для приготовления газопереносящих эмульсий ПФС. *ВИНИТИ*. 1984;148. [Kaptsov V.V., Alymov A.V., Shibayev N.V., Kukushkin V.I., Mayevskiy Ye.I. Vybory sposobov i ustroystv dispergirirovaniya dlya prigotovleniya gazoprenosyashchikh emul'siy PFS [The choice of methods and devices for dispersing for the preparation of gas-transfer emulsions PFC]. *VINITI* [VINITI J.]. 1984;148. (In Russian)].
8. Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Агельдинов Р.А., Люблинский С.Л., Каркищенко Н.Н. Липосомированная форма экстракта препуциальной железы кабарги — новое средство адаптогенного действия. *Биомедицина*. 2019;15(4):34–45. [Karkischenko V.N., Dulya M.S.,

- Ageldinov R.A., Lyublinskiy S.L., Karkischenko N.N. Liposomirovannaya forma ekstrakta preputzial'noy zhelezy kabargi — novoye sredstvo adaptogenno deystviya [A liposomal composition of musk deer preputial gland extract as a new agent of adaptogenic]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2019;15(4):34–45. (In Russian)].
9. Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Хвостов Д.В., Агельдинов Р.А. Люблинский С.Л. Анализ биологически активных соединений мускуса кабарги *Moschus moschiferus* методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором. *Биомедицина*. 2018;1:34–45. [Karkischenko V.N., Dulya M.S., Khvostov D.V., Ageldinov R.A., Lyublinskiy S.L. Analiz biologicheskii aktivnykh soyedineniy muskusa kabargi *Moschus Moschiferus* metodom gazovoy khromatografii s mass-selektivnym detektorom [Analysis of biologically active musk compounds of musk deer (*Moschus Moschiferus*) by gas chromatography with mass selective detector]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2018;1:34–45. (In Russian)].
10. Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Хвостов Д.В., Агельдинов Р.А., Люблинский С.Л., Каркищенко Н.Н. Протеомный анализ в идентификации белковых компонентов препуциальной железы кабарги сибирской. *Биомедицина*. 2019;15(1):34–45. [Karkischenko V.N., Dulya M.S., Khvostov D.V., Ageldinov R.A., Lyublinskiy S.L. Proteomnyy analiz v identifikatsii belkovykh komponentov preputzial'noy zhelezy kabargi sibirskoy [Proteomic analysis in the identification of active components in the preputial gland secretion of the Siberian musk deer]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2019;15(1):34–45. (In Russian)].
11. Каркищенко В.Н., Каркищенко Н.Н., Шустов Е.Б. *Фармакологические основы терапии*. Тезаурус. Изд. 3-е — новая ред. М., СПб: Айсинг, 2018:288. [Karkischenko V.N., Karkischenko N.N., Shustov E.B. *Farmakologicheskie osnovy terapii [The pharmacological therapeutics basis]*. Thesaurus. Ed. 3th — new ed. Moscow, Saint-Petersburg: Ajsing Publ., 2018:288. (In Russian)].
12. Краснополянский Ю.М., Дудниченко А.С., Швец В.И. *Фармацевтическая биотехнология: бионанотехнология в фармации и медицине*. Харьков: Издательский центр НТУ «ХПИ», 2011:227. [Krasnopol'skiy Yu.M., Dudnichenko A.S., Shvets V.I. *Farmatsevticheskaya biotekhnologiya: bionanotekhnologiya v farmatsii i meditsine [Pharmaceutical biotechnology: bionanotechnology in pharmacy and medicine]*. Kharkov: Publishing Center NTU "KhPI", 2011:227. (In Russian)].
13. Краснополянский Ю.М., Степанов А.Е., Швец В.И. Технологические аспекты получения липосомальных препаратов в условиях GMP. *Биофармацевтический журнал*. 2009;1(3):18–29. [Krasnopol'skiy Yu.M., Stepanov A.Ye., Shvets V.I. Tekhnologicheskiye aspekty polucheniya liposomal'nykh preparatov v usloviyakh GMP [Technological aspects of obtaining liposomal preparations under GMP conditions]. *Biopharmaceutical journal*. 2009;1(3):18–29. (In Russian)].
14. Кузякова Л.М., Ефременко В.И. *Медикаментозное преодоление анатомических и клеточных барьеров с помощью липосом*. Ставрополь: Б.и., 2000:169. [Kuzyakova L.M., Yefremenko V.I. *Medikamentoznoye preodoleniye anatomicheskikh i kletochnykh bar'yerov s pomoshch'yu liposom [Drug overcoming of anatomical and cellular barriers using liposomes]*. Stavropol: B.I., 2000:169. (In Russian)].
15. Посте Дж. Взаимодействие липидных везикул (липосом) с клетками в культуре и их использование как переносчиков лекарств и макромолекул. В кн.: *Липосомы в биологических системах*. М.: Медицина, 1988:107–155. [Poste Dzh. Vzaimodeystviye lipidnykh vezikul (liposom) s kletkami v kul'ture i ikh ispol'zovaniye kak perenoschikov lekarstv i makromolekul [Interaction of lipid vesicles (liposomes) with cells in culture and their use as carriers of drugs and macromolecules]. V kn.: *Liposomy v biologicheskikh sistemakh [In the book: Liposomes in biological systems]*. Moscow: Medicine Publ., 1988:107–155. (In Russian)].
16. Рингсдорф Г., Шмидт Б. Системы полимерных носителей лекарств. *Журнал всесоюзного химического общества им. Д.И. Менделеева*. 1987;32(5):487–501. [Ringsdorf G., Shmidt B. Sistemy polimernykh nositeley lekarstv [Systems of polymer carriers of drugs]. *Zhurnal vsesoyuznogo khimicheskogo obshchestva im. D.I. Mendeleeva [Journal of the All-Union Chemical Society named after D.I. Mendeleev]*. 1987;32(5):487–501. (In Russian)].
17. Сейфулла Р.Д. *Фармакология липосомальных препаратов*. М.: Глобус Континенталь, 2010:241. [Seyfulla R.D. *Farmakologiya liposomal'nykh preparatov [Pharmacology of liposomal preparations]*. Moscow: Globus Continental Publ., 2010:241. (In Russian)].
18. Уйба В.В., Котенко К.В., Коржачкина Н.Б., Петрова Н.Б., Михайлова А.А. *Применение мускуса кабарги в клинической практике*. Метод. реком. М., 2013:18. [Uyba V.V., Kotenko K.V., Korzhachkina N.B., Petrova N.B., Mikhaylova A.A. *Primeneniye muskusa kabargi v klinicheskoy praktike [Application of musk of musk deer in clinical practice]. Methodical recommendations*. Moscow, 2013:18. (In Russian)].
19. Чазов Е.И., Смирнов В.Н., Торчилин В.П. Липосомы как средство направленного транспорта лекарств. *Журнал всесоюзного химического общества им. Д.И. Менделеева*, 1987;32(5):502–513. [Chazov Ye.I., Smirnov V.N., Torchilin V.P. Liposomy kak sredstvo napravlennogo transporta lekarstv [Liposomes as a Means of Directed Transport of Drugs]. *Zhurnal vsesoyuznogo khimicheskogo ob-*

- shchestva im. D.I. Mendeleeva [Journal of the All-Union Chemical Society named after D.I. Mendeleev]. 1987;32(5):502–513. (In Russian)].*
20. Швец В.И., Краснополянский Ю.М., Сорокумова Г.М. *Липосомальные формы лекарственных препаратов: технологические особенности получения и применения в клинике.* М.: Ремедиум, 2017:197. [Shvets V.I., Krasnopol'skiy Yu.M., Sorokoumova G.M. *Liposomal'nyye formy lekarstvennykh preparatov: tekhnologicheskiye osobennosti polucheniya i primeneniya v klinike [Liposomal forms of drugs: technological features of production and use in the clinic].* Moscow: Remedium Publ., 2017:197. (In Russian)].
 21. Kaptsov V.V. Production PPG submicron emulsions and liposomes with high pressure homogenizer. "Donor-1". *Artificial cells, blood substitutes, and biotechnology*, 1994;22(5):110.
 22. Kaszuba M., McKnight D., Connah M.T., McNeil-Watson F.K., Nobbmann U. Measuring sub nanometer sizes using dynamic light scattering. *J. of Nanoparticle Research*, 2008;10:823–829.
 23. Mahmud M., Piwoni A., Filipczak N., Janicka M., Gubernator J. Long-Circulating Curcumin-Loaded Liposome Formulations with High Incorporation Efficiency, Stability and Anticancer Activity towards Pancreatic Adenocarcinoma Cell Lines in vitro. *PLoS One*. 2016;11(12):e0167787.
 24. Rejman J., Oberle V., Zuhom I.S., Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clatrin and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. Journal*, 2004;377(1):159–169.
 25. Tohver V., Smay J.E., Braem A., Braun P.V., Lewis J.A. Nanoparticle halos: A new colloid stabilization mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001;98(16):8950–8954.
 26. https://bio.pnpi.nrcki.ru/wp-content/uploads/2020/01/Photocor-Compact-Z_Manual.pdf
 27. <https://www.malvernpanalytical.com/ru/products/measurement-type/zeta-potential>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Люблинский Станислав Львович, к.б.н.,
ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: mobitek-m@mail.ru

Люблинская Ирина Николаевна*, ООО «Научно-производственная фирма “МОБИТЕК-М”»;
e-mail: mobitek-m@mail.ru

Колоскова Елена Михайловна, к.б.н.,
ООО «Научно-производственная фирма “МОБИТЕК-М”»;
e-mail: heleko3@yandex.ru

Азизов Ариф Мурсали Оглы, ООО «Научно-производственная фирма “МОБИТЕК-М”»;
e-mail: ximreaktiv@gmail.com

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н.,
проф., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: scbmt@ya.ru

Нестеров Максим Сергеевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: mdulya@gmail.com

Капцов Александр Владимирович, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: a_v_kaptsov@mail.ru

Stanislav L. Lyublinskiy, Cand. Sci. (Biol.),
Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: mobitek-m@mail.ru

Irina N. Lyublinskaya*, Scientific and Production Company “МОБИТЕК-М”;
e-mail: mobitek-m@mail.ru

Elena M. Koloskova, Cand. Sci. (Biol.), Scientific and Production Company “МОБИТЕК-М”;
e-mail: heleko3@yandex.ru

Arif M. Azizov, Scientific and Production Company “МОБИТЕК-М”;
e-mail: ximreaktiv@gmail.com

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof.,
Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: scbmt@ya.ru

Maksim S. Nesterov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: mdulya@gmail.com

Alexander V. Kaptsov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: a_v_kaptsov@mail.ru

Агельдинов Руслан Андреевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»; ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»;
e-mail: ageldinov@gmail.com

Герасимов Владимир Николаевич, д.б.н., ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»;
e-mail: ilcvngerasimov@obolensk.org

Гриненко Дмитрий Владимирович, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»;
e-mail: ilcvngerasimov@obolensk.org

Ruslan A. Ageldinov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia; Mendeleev University Chemical Technology of Russia;
e-mail: ageldinov@gmail.com

Vladimir N. Gerasimov, Dr. Sci. (Biol.), State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology;
e-mail: ilcvngerasimov@obolensk.org

Dmitrii V. Grinenko, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology;
e-mail: ilcvngerasimov@obolensk.org

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author