

МОДИФИКАЦИЯ И УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СОСТАВА ЛИПОСОМ ЭКСТРАКТА ПРЕПУЦИАЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МУСКУСА КАБАРГИ СИБИРСКОЙ

М.С. Нестеров^{1,*}, Р.А. Агельдинов¹, Д.В. Хвостов¹, С.Л. Люблинский¹,
И.Н. Люблинская², В.Н. Каркищенко¹

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

Охарактеризована липосомальная форма нового оригинального продукта на основе препуциальной железы мускуса кабарги сибирской с модификацией состава в комплексе включения с β -циклодекстрином. Для препаративного получения липосом мускуса кабарги использован эффективный и масштабируемый метод гомогенизации при высоком давлении. Полученный липосомальный продукт охарактеризован методами просвечивающей электронной микроскопии, динамического светорассеяния, препаративной и аналитической хроматографии, хромато-масс-спектрометрии. Разработана спецификация на липосомальную форму экстракта препуциальной железы кабарги сибирской, включающая все критические показатели качества продукта. Получены гомогенные дисперсии липосом мускуса кабарги с равномерным распределением по размерам — с максимумами распределения при 50 и 240 нм. Установлена высокая физико-химическая стабильность липосомальной дисперсии: дзета-потенциал полученных наночастиц составил $-5...-35$ мВ. Степень включения в липосомы целевых компонентов мускуса кабарги по данным гель-размерной хроматографии и масс-спектрометрии для липосом мускуса по стероидным компонентам и общему белку составила 58–75%. Изученные показатели качества липосомального продукта позволяют получать высоко эффективный продукт на основе липосомальной формы экстракта мускуса кабарги, модифицированной циклодекстрином, как адаптоген природного происхождения с усиленной и выраженной активностью в лабораторных тестах на работоспособность.

Ключевые слова: кабарга, мускус, комплексы включения, критические показатели качества, препуциальная железа, липосомы, хроматография, масс-спектрометрия, адаптогены, пептиды, белки, андростероиды, циклодекстрины

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: государственное задание по теме «Создание и исследование лекарственного препарата, содержащего стабилизированные в липидах устойчивые наночастицы комплекса биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги, предназначенного для повышения работоспособности» (шифр: «Технология-2») ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Для цитирования: Нестеров М.С., Агельдинов Р.А., Хвостов Д.В., Люблинский С.Л., Люблинская И.Н., Каркищенко В.Н. Модификация и усовершенствование состава липосом экстракта препуциальной железы мускуса кабарги сибирской. *Биомедицина*. 2023;19(3):29–35. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-3-29-35>

Поступила 28.04.2023

Принята после доработки 31.07.2023

Опубликована 10.09.2023

MODIFICATION AND IMPROVEMENT OF THE LIPOSOME COMPOSITION OF PREPUTIAL GLAND EXTRACT OF SIBERIAN MUSK DEER

Maxim S. Nesterov^{1,*}, Ruslan A. Ageldinov¹, Daniil V. Khvostov¹,
Stanislav L. Lyublinskiy¹, Irina N. Lyublinskaya², Vladislav N. Karkischenko¹

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

In this work, we set out to characterize the liposomal form of a new original product based on the preputial gland extract of Siberian musk deer whose composition was modified by an inclusion complex with β -cyclodextrin. Musk deer liposomes were obtained by an efficient and scalable high-pressure homogenization method. The resulting liposomal product was characterized by transmission electron microscopy, dynamic light scattering, preparative and analytical chromatography, and gas chromatography-mass spectrometry. A specification for the liposomal form of Siberian musk deer extract was developed, which includes all critical indicators of product quality. Homogeneous dispersions of musk deer liposomes with a uniform size distribution were obtained, with the distribution maxima observed at 50 and 240 nm. The high physicochemical stability of the liposomal dispersion was established with the zeta potential value of the obtained nanoparticles ranging from -5 to -35 mV. According to size-exclusion chromatography and mass spectrometry, the incorporation of deer musk target components into liposomes reached 58–75% for musk liposomes in terms of steroid components and total protein. The revealed quality indicators of the studied liposomal product indicate the possibility of obtaining highly effective products based on the liposomal form of musk deer extract, modified with cyclodextrin, as an adaptogen of natural origin with an enhanced and pronounced activity in laboratory performance tests.

Keywords: musk deer, musk, gland, liposomes, chromatography, mass spectrometry, adaptogens, peptides, proteins, androsteroids, cyclodextrin

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

Funding: the research topic "Creation and study of a medicinal product containing lipid-stabilized stable nanoparticles of a complex of biologically active substances isolated from musk deer musk, intended to improve performance" (code: "Technology-2") of state assignment of the Scientific Center of Biomedical Technologies of FMBA of Russia.

For citation: Nesterov M.S., Ageldinov R.A., Khvostov D.V., Lyublinskiy S.L., Lyublinskaya I.N., Karkischenko V.N. Modification and Improvement of the Liposome Composition of Preputial Gland Extract of Siberian Musk Deer. *Journal Biomed.* 2023;19(3):29–35. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-3-29-35>

Submitted 28.04.2023

Revised 31.07.2023

Published 10.09.2023

Введение

В последнее время во всём мире проводятся исследования по изучению влияния различных вспомогательных веществ на эффективность и качество лекарственных препаратов. Известно, что вспомогательные вещества позволяют регулировать основные константы фармакокинетики (из-

менение концентрации вещества во времени) и фармакодинамики (совокупность эффектов, вызываемых лекарством) и, таким образом, повышать эффективность лекарственной терапии.

Одними из таких веществ являются циклодекстрины. Помимо производства пищевых продуктов и косметических средств,

они нашли широкое применение в фармацевтической промышленности в качестве систем доставки лекарств. Циклодекстрины могут служить защитными агентами, которые предотвращают преждевременный метаболизм лекарств и, таким образом, делают возможным, например, пероральное, а не внутривенное введение. Они могут изменять растворимость лекарств, в т. ч. слаборастворимых, и особенности их биологического транспорта, увеличивая специфичность к мишени. Комплексы циклодекстринов с биологически активными молекулами повышают их стабильность в среде физиологических жидкостей и при хранении, улучшают вкусовые качества, маскируя неприятные или горькие привкусы, усиливают их фармакологическую активность и пролонгируют терапевтического действие, снижают побочные эффекты и т. д.

Основной интерес исследователей к изучению циклодекстринов связан именно с их способностью образовывать комплексы включения с различными группами различных органических и неорганических соединений. Это свойство определяется тем, что циклодекстрины представляют собой уникальные природные наноструктуры, снабжённые гидрофобной внутренней полостью и гидрофильной внешней поверхностью, т. н. «молекулярные контейнеры», которые способны удерживать во внутренней полости неполярные, неионизированные молекулы вещества-«гостя». Это приводит к образованию комплекса включения, что придаёт гидрофобным молекулам вещества-«гостя» уникальное свойство растворяться в водной фазе за счёт гидрофильной наружной поверхности «молекулярного контейнера». Очевидно, что способность молекул вещества-«гостя» встроиться в полость олигосахаридов (т. н. «хозяина») и стабильность образующегося комплекса включения зависят не только от полярности и размера этих молекул, но также и от фи-

зико-химических свойств молекул циклодекстринов.

Целью работы было комплексное исследование физико-химических свойств ряда критических показателей качества липосомированной формы мускуса кабарги сибирской после модификации их β -циклодекстрином.

Данный олигосахарид имеет 7 остатков глюкозы, молекулярную массу — 1134 Да, с внешним диаметром 15,4 А и диаметром полости тора 7,8 А. При нормальных условиях одна молекула β -циклодекстрина может ассоциировать 9,6 молекулы воды. Способность циклодекстринов образовывать прочные комплексы с гидрофобными «гостями» в водных растворах обусловлена строением их внутримолекулярной полости. Данная полость, образованная углеводородным окружением и гликозидными атомами кислорода, является малополярной и гидрофобной по сравнению с внешней поверхностью. При этом возникающее и исчезающее в молекуле «хозяина» напряжение предопределяет одну из движущих сил клатратообразования.

Диаметр внутренней полости β -циклодекстрина хорошо соответствует размерам молекул большого множества субстратов, в т. ч. биологически активных веществ (БАВ) из мускуса кабарги.

Учитывая вышеизложенное, было сделано предположение о возможности образования молекулярных комплексов включения (клатратов) между β -циклодекстрином, липосомами, а также отдельными БАВ мускуса кабарги.

Экстракт мускуса кабарги — продукт препуциальной железы кабарги сибирской (*Moschus moschiferus*) — давно известен как вещество, обладающее широким спектром биологической активности, обусловленной многокомпонентным составом: андростероиды и их метаболиты, гетероциклические соединения (пиримидины и фу-

раны), воски, жиры, сложные эфиры холестерина, белки и пептиды и т. д. [2]. Такой сложный и многокомпонентный состав предъявляет особые требования к форме лекарственного средства, обеспечивающей биологическую доступность, снижение системной токсичности, защиту от деградации, контроль высвобождения и целевую доставку фармацевтической субстанции. Одним из подходящих форм лекарственного средства на основе мускуса кабарги являются липосомы [1].

Ввиду большого разнообразия липосом как по строению, так и по составу липидной мембраны, ряд критериев используется для стандартизации липосомированных форм препаратов. Анализ химической стабильности липосом включает в себя оценку степени окисления и гидролиза фосфолипидных компонентов, самоокисления холестерина и деградацию антиоксидантного компонента. Анализ физических характеристик липосом включает в себя показатели распределения по размеру, электрического поверхностного потенциала (ζ -потенциал), температуру фазового перехода, эффективности включения фармакологических субстанций, а также их высвобождения в целевой биосреде [5, 6].

Наиболее часто встречающийся диаметр коммерческих одноламеллярных липосом лежит в диапазоне 70–200 нм, притом что в исследовательских работах встречаются везикулы диаметром от нескольких нанометров до нескольких микрометров. Везикулы с диаметром более 200 нм имеют тенденцию к преобразованию в мультламеллярный тип, при котором стенка состоит из десятков или сотен бислоев фосфолипидов, что существенно замедляет высвобождение активных компонентов [4]. Принято считать, что чем выше ζ -потенциал (вне зависимости от знака), тем более стабильны коллоидные растворы липосом. Однако рост потенциала выше 40 мВ приводит к взаимодействию с рас-

творителем и формированию крупных агрегатов. Исходя из назначения везикул, также существует оптимум ζ -потенциала. Так, в экспериментах на мышах было показано, что $\zeta = -7,6$ мВ обеспечивает более длительное циркулирование липосом в организме и их высокое накопление в опухоли [3].

Материалы и методы

Липосомированную форму мускуса кабарги сибирской получали методом гомогенизации высоким давлением, описанным ранее [2].

Визуализацию липосом мускуса кабарги проводили в просвечивающем электронном микроскопе Tecnai G2 Spirit bioTWIN («FEI», США) при ускоряющем напряжении 120 кВ и 5000–80000-кратных увеличениях методом негативного контрастирования. Оценку среднего диаметра и распределения по размеру липосом проводили методом динамического рассеяния света на анализаторе Photocor Compact-Z (ООО «Фотокор», Россия). Оценку ζ -потенциала проводили методом электрофоретического рассеяния света на анализаторе Photocor Compact-Z (ООО «Фотокор», Россия). Индекс окисленности определяли спектрофотометрически (Multiscan Go, «Thermo Fisher Scientific», США) как соотношение интенсивности полос поглощения в УФ-спектре анализируемых липосом, A233/A215, что достаточно полно отражает процессы окисления, проходящие в липидах как в ходе получения и хранения липидов, так и при формировании липосом.

Для получения комплексов включения и модификации состава липосом применялся β -циклодекстрин — нативный циклический олигосахарид, полученный в результате биотехнологической конверсии крахмала.

Хромато-масс-спектрометрический анализ для подтверждения стероидной подлинности получаемого продукта выполняли на ГХ-МС анализаторе «Хроматэк», состо-

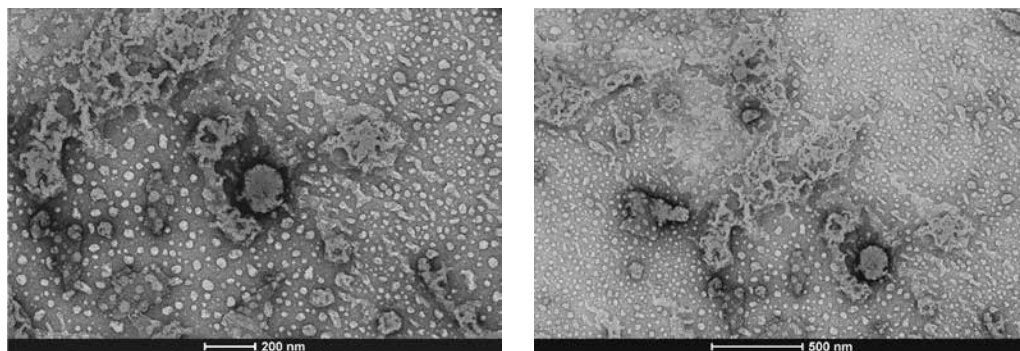


Рис. Микрофотографии липосом мускуса кабарги, модифицированных циклодекстрином (ускоряющее напряжение 120 кВ; увеличение от 5000 до 80 000 крат; негативное контрастирование)

Fig. Micrographs of musk deer liposomes modified with cyclodextrin (accelerating voltage 120 kV; magnification from 5000 to 80,000 times; negative contrast)

ящем из газового хроматографа «Хроматэк-Кристалл 5000» и жидкостного дозатора ДАЖ-2М (ЗД). Оценку степени включения биологически активных компонентов мускуса кабарги в состав липосом проводили методом хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения на хроматографической системе 1290 Q-TOFF 6545 XT («Agilent Technologies», США). В анализ на оценку степени включения отбирали фракции липосом после гель-размерной хроматографии, очищенные от невключённых компонентов липидной мембраны и исходного сырья. Целевыми маркерами продукта служили стероидная фракция, общий белок и холестерин.

Результаты исследований

Микрофотографии липосом мускуса кабарги убедительно подтверждают подлинность полученной в условиях технологического процесса липосомальной субстанции для трёх испытуемых серий продукта. На рисунке видны монослоистые везикулы (липосомы) округлой формы, размером от 50 до 350 нм с преобладающей фракцией частиц размером около 200 нм.

Прослеживаются отдельные монослоистые липосомы сферической формы,

что также подтверждает подлинность субстанции. На переднем плане чётко видны несколько крупных липосом размером от 300 до 500 нм, хорошо нагруженных (окрашенных) гидрофильными (внутренний объём везикул) и гидрофобными (пространство внутри внешнего бислоя везикул, образованного фосфолипидами) компонентами, входящими в состав мускуса кабарги. Необходимо подчеркнуть, что на всех микрофотографиях основная фракция липосом представлена частицами с диаметром около 200 нм.

Значение индекса окисленности испытуемых растворов липосом мускуса кабарги не превышает показателя 0,5.

Вывод

В результате мультиметодического анализа трёх технологических серий липосомальной формы экстракта мускуса кабарги разработан проект спецификации продукта на основе экстрактивного материала мускуса кабарги сибирской, модифицированного циклодекстринами, для применения в биологических тестах на лабораторных животных для анализа физической выносливости и работоспособности (табл.).

Таблица. Критические показатели качества липосом, модифицированных циклодекстрином, содержащих комплекс БАВ, выделенных из мускуса кабарги

Table. Critical quality indicators of liposomes containing a complex of biological activity substances isolated from musk

Показатель	Метод	Норма
Описание	Органолептический ГФ XIII, ОФС 1.1.0006.15, ч. 1	Лифолизированный аморфный порошок светло-коричневого 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: - наличие БАВ мускуса	ВЭЖХ-УФ	Время удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основных пиков на хроматограмме стандартного образца липосом мускуса кабарги
Размер частиц	ГФ XII, ч. 2. Фотодинамическое и лазерное светорассеяние	Не менее 90% с размером от 100 до 1000 нм
Индекс полидисперсности	Фотодинамическое и лазерное светорассеяние	Не более 0,5
Дзета-потенциал	Динамическое светорассеяние	-25...-60 мВ
Степень включения БАВ мускуса	Гель-хроматография ВЖХ-МС	Не менее 50% Не менее 50%
Индекс окисленности	Спектрофотометрия	Не более 0,5
pH	ГФ РФ, ОФС 1.1.0006.15 (потенциометрический метод)	От 6,0 до 8,0 (1%-ный раствор)
Вода	ГФ РФ, ОФС 1.2.3.0002.15	Не более 5,0%
Общий белок (растворимая фракция)	ГФ РФ, ОФС 1.2.3.0012.15 Метод Бредфорд (колориметрический)	Не более 10,0%
В-Циклодекстрин	Спектрофотометрия	Не менее 10%
Гуммиарабик		Не менее 5%
Фосфолипиды (в пересчёте на фосфор)	Спектрофотометрия	Не менее 30%
Сульфатная зола	ГФ РФ, ОФС 1.2.2.2.0014.15	Не более 10,0%
Тяжёлые металлы	ГФ РФ, ОФС 1.2.2.2.0012.15	Не более 0,002%
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 пересчёте на безводное вещество относительно стандартного образца липосом мускуса кабарги
Хранение	В сухом защищённом от света месте при температуре не выше 20 °С	
Срок годности	Устанавливается	

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- 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 preputsiaľnoy zhelezy kabargi — novoe sredstvo adaptogennoĝo deystviya [A liposomal composition of musc deer preputial gland extract as a new agent of adaptogen-ic]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2019;15(4):34–45. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-15-4-34-45.
- Нестеров М.С., Агельдинов Р.А., Хвостов Д.В., Кохан В.С., Левашова А.И., Люблинский С.Л., Каркищенко В.Н. Стандартизация критических показателей качества липосом экстракта препуциальной железы мускуса кабарги сибирской. *Биомедицина*. 2021;17(3):62–67. [Nesterov M.S., Ageldinov R.A., Khvostov D.V., Kokhan V.S., Levashova A.I., Lyublinskiy S.L., Karkischenko V.N.

- Standartizatsiya kriticheskikh pokazateley kachestva liposom ekstrakta preputsia'n'noy zhelezy muskusa kabargi sibirskoy [Standardization of critical quality indicators of liposomes of Siberian musk deer prepuce gland extract]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2021;17(3):62–67. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-17-3-62-67.
3. Bulbake U., Doppalapudi S., Kommineni N., Khan W. Liposomal formulations in clinical use: An updated review. *Pharmaceutics*. 2017;9(2):12. DOI: 10.3390/pharmaceutics9020012.
4. Lee J.S., Ankone M., Pieters E., Schiffelers R.M., Hennink W.E., Feijen J. Circulation kinetics and biodistribution of dual-labeled polymersomes with modulated surface charge in tumor-bearing mice: comparison with stealth liposomes. *J Control Release*. 2011;155(2):282–288. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.07.028.
5. Maherani B., Arab-tehrany E., Kheiriloomoom A., Reshetov V., Stebe M.J., Linder M. Optimization and characterization of liposome formulation by mixture design. *Analyst*. 2012;137(3):773–786. DOI: 10.1039/c1an15794a.
6. Zylberberg C., Matosevic S. Pharmaceutical liposomal drug delivery: A review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. *Drug Deliv*. 2016;23(9):3319–3329. DOI: 10.1080/10717544.2016.1177136.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Нестеров Максим Сергеевич*, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

e-mail: mdulya@gmail.com

Maxim S. Nesterov*, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: mdulya@gmail.com

Агельдинов Руслан Андреевич, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

e-mail: ageldinov@gmail.com

Ruslan A. Ageldinov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: ageldinov@gmail.com

Хвостов Даниил Владиславович, к.т.н.,
ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

e-mail: daniil_hvostov@mail.ru

Daniil V. Khvostov, Cand. Sci. (Tech.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: daniil_hvostov@mail.ru

Люблинский Станислав Львович, к.б.н.,
ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

e-mail: mobitek-m@mail.ru

Stanislav L. Lyublinskiy, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical Biological Agency of Russia;

e-mail: mobitek-m@mail.ru

Люблинская Ирина Николаевна, ООО «Научно-производственная фирма “МОБИТЕК-М”»;

e-mail: mobitek-m@mail.ru

Irina N. Lyublinskaya, Scientific and Production Company “MOBITEK-M”;

e-mail: mobitek-m@mail.ru

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н.,
проф., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

e-mail: scbmt@yandex.ru

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: scbmt@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author