

УДК 615.457.3; 543.544.5.068.7; 543.422.3  
DOI: 10.15587/2519-4852.2017.109003

## ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ЛИПОСОМ НА СТЕПЕНЬ ИНКАПСУЛЯЦИИ И РАЗМЕР ЧАСТИЦ ПРИ СОЗДАНИИ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ЦИТОХРОМА С

© А. Г. Кацай, Е. А. Рубан, Ю. М. Краснопольский

*Рассмотрено влияние состава липосом на степень инкапсуляции и размер частиц при фармацевтической разработке липосомальной формы цитохрома С.*

**Цель работы:** изучение влияния состава липосом на степень инкапсуляции и размер частиц при создании липосомальной формы цитохрома С, применяемой в качестве средства для терапии офтальмологических заболеваний.

**Методы.** Липосомальная форма цитохрома С получена гомогенизацией высокого давления. Инкапсуляцию цитохрома С проводили по методу химической связи, который основан на возможности образования химической связи между компонентами бислоя липосом и активным фармацевтическим ингредиентом. Для определения степени инкапсуляции была разработана методика ВЭЖХ, основанная на методе гель-фильтрации. Определение проводили на хроматографе Shimadzu (Япония).

**Результаты.** Определен состав мембраны липосом позволяющий получить наночастицы с высокой степенью инкапсуляции цитохрома С – до 95,88 % и размером частиц в нанодиапазоне до 150 нм

**Выводы:** Проведено изучение оптимального состава мембраны липосом, содержащих дипальмитоилфосфатидилглицерол и фосфатидилхолин, для дальнейшего изучения этого липосомального комплекса в качестве средства терапии в офтальмологии.

Установлено что оптимальным составом липосом является соотношение фосфатидилхолина и дипальмитоилфосфатидилглицерола (1,2–4,0:1), обеспечивающего максимальную инкапсуляцию цитохрома С в липосомах.

Разработаны методики определения степени инкапсуляции Ц-С. Инкапсуляция Ц-С составила не менее 95,0 %

**Ключевые слова:** Цитохром С, фосфолипиды, липосомы, гомогенизация, степень инкапсуляции, размер частиц

### 1. Введение

Цитохром С (Ц-С) является катализатором клеточного дыхания, который стимулирует окислительные реакции и процессы регенерации, активизирует метаболизм в тканях, а также уменьшает гипоксию ткани при различных патологических состояниях.

Ц-С широко используют в терапии офтальмологических заболеваний, где он проявляет высокую активность относительно свободных радикалов, связывает агрессивные молекулы оксидантов, защищает хрусталик и роговицу от повреждений; подавляет и предотвращает развитие помутнения хрусталика (катаракты), препятствует дегенерации сетчатки глаза.

### 2. Постановка проблемы в общем виде, актуальность темы и ее связь с важными научными или практическими вопросами

Сегодня на фармацевтическом рынке Украины известны глазные капли с Ц-С «ОФТАН КАТАХРОМ» производства «Сантен» Финляндия.

Эти капли являются водным раствором Ц-С, которые имеют ряд существенных недостатков: Ц-С незначительно проникает через биологические мембраны в клетки и достаточно быстро выводится из организма.

Указанные недостатки обуславливают снижение биодоступности и требуют длительной терапии препаратом [1]. Таким образом, одной из ключевых проблем повышения эффективности Ц-С содержащих препаратов в лечении офтальмологических заболеваний является создание лекарствен-

ных форм Ц-С, обладающих более высокой биодоступностью.

Для решения этой проблемы целесообразным является создание глазных капель на основе липосомальной формы цитохрома С (ЛС-Ц).

### 3. Анализ последних исследований и публикаций, в которых начато решение данной проблемы и на которые опирается автор

Наличие липидной части в молекуле комплекса обуславливает его липофильность, что облегчает проникновения комплекса через липидные участки биомембран, а также способствует удержанию его в деструктивных участках [2]. Что также, в свою очередь, увеличит проникновение Ц-С в ткани глаза и повысит эффективность использования цитохрома С. [3–5].

Так ранее, в работе [3], авторами было показано, что применение ЛС-Ц заметно замедляет начало развития катаракты.

Для доказательства терапевтической эффективности ЛС-Ц в сравнении с нативной формой Ц-С были проведены фармакологические исследования [4], которые показали, что предлагаемые ЛС-Ц обеспечивают повышенную терапевтическую эффективность (в 1,4–2,0 раза) при изученных патологиях и пролонгированность действия по сравнению с нативной формой Ц-С.

В работе [5] показано, что входящие в состав липосом (ЛС) фосфолипиды образуют полярную гидрофильную поверхность везикул и высоколипофильную среду внутри бислоя. Это создает характер-

ную для ЛС амбивалентность, что определяет условия для их проникновения через гидрофильные и липофильные среды глаза, в том числе через барьеры передней и задней камер глаза. Благодаря этому ЛС являются эффективным средством транспорта лекарственных препаратов при инстиляции в конъюнктивный мешок для целенаправленной доставки в конъюнктиву, хрусталик и ресничное тело.

#### 4. Выделение нерешенных ранее частей общей проблемы, которой посвящена статья

ЛС занимают особое место в современных системах доставки, которые имеют ряд преимуществ по сравнению с другими наночастицами. Современные требования к контролю ЛС средств изложены в монографии ДФУ 2.0 [6] и FDA «Guidance for industry Liposome Drug Products» [7]. Оценка степени инкапсуляции активного фармацевтического ингредиента (АФИ) и размера частиц является необходимым условием разработки ЛС средств.

Ранее в работе [3] степень инкапсуляции Ц-С в предложенные авторами ЛС композиции, содержащие соевый фосфатидилхолин, холестерин и стеарилламин, составила 35–38 %.

Степень инкапсуляции Ц-С в ЛС, состоящие из лецитина, холестерина и смеси кислых фосфолипидов [4], составила 55–60 %.

Составы ЛС [8], содержащие в своем составе смесь негативно заряженных фосфолипидов (фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, цереброзидов, сульфатцереброзидов, сфингомиелина), обеспечивали степень инкапсуляции 70–85 %

В этом исследовании был предложен состав ЛС, обеспечивающий инкапсуляцию Ц-С не менее 95 %.

#### 5. Формулирование целей (задач) статьи

Исследования посвящены изучению влияния состава липосом (ЛС) на степень инкапсуляции и размер частиц при создании ЛС-Ц, применяемой в качестве средства для терапии офтальмологических заболеваний.

#### 6. Изложение основного материала исследования (методов и объектов) с обоснованием полученных результатов

Хорошо известна способность Ц-С образовывать комплексы с анионными фосфолипидами в биологических мембранах [9, 10], что является определяющим в белок-липидном взаимодействии Ц-С. Основываясь на этих данных предложено использовать в составе наночастиц анионный фосфолипид – дипальмитоилфосфатидилглицерин (ДПФГ). В качестве мембранообразующего липида использован основной компонент мембран эукариотов – фосфатидилхолин (ФХ). Используя эти компоненты в различных соотношениях и концентрациях после проведения экспериментального изучения, предложен состав, обеспечивающий максимальную инкапсуляцию Ц-С. Причем, степень инкапсуляции Ц-С зависит от соотношения используемых липидных компонентов и количества взятого Ц-С. В этих условиях положительно заряженные аминокислотные группы на молекулах Ц-С вступают во взаимодействие с отрицательно заряженными группами на молекуле ДПФГ.

Предложена схема получения ЛС-Ц, которая сводится к получению пленки липидов и её эмульгированию в растворе Ц-С для получения эмульсии мультиламелярных везикул с последующей гомогенизацией высокого давления и стерилизующей фильтрацией [11].

Были исследованы 6 композиций мембран ЛС с соотношением (ФХ:ДПФГ) 5,0:1,0; 4,0:1,0; 3,6:1,0; 2,4:1,0; 1,20:1,0; 0,6:1,0.

ДПФГ и ФХ в растворяли в смеси хлороформ:этанол (4:1). Полученный раствор упаривали на ротационном испарителе BUCHI Rotavapor R215 (Швейцария) до образования липидной пленки. Липидную пленку гидратировали раствором Ц-С, при соотношении Ц-С: липиды – 1: 16–35 соответственно, на орбитальном шейкере IKA werke (Германия) до образования гомогенной эмульсии мультиламелярных ЛС.

Полученную эмульсию мультиламелярных ЛС гомогенизировали на гомогенизаторе высокого давления microfluidizer M110P (USA) Оптимальный температурный режим гомогенизации находился в пределах 38–44 °С и давлении 900 bar. Все работы по получению липосом проводили в атмосфере азота. В случаях, когда включение Ц-С было неполным, «свободный» Ц-С оставшийся в водной среде может быть отделен ультрафильтрацией. Полученную ЛС эмульсию подвергали стерилизующей фильтрации через мембранные фильтры Pall (США) 0,22 мкм.

Преимуществом получения ЛС методом гомогенизации высокого давления является стандартность и возможность масштабирования, высокая производительность метода, минимальное окисление и гидролиз фосфолипидов, сохранение лекарственного препарата, стабильность ЛС и возможность постоянного контроля температуры и давления в процессе технологии. Режим гомогенизации позволяет получить ЛС стандартного состава, основная масса которых представлена частицами размером 120–150 нм.

Для определения степени инкапсуляции Ц-С были предложены методики определения общей концентрации Ц-С и концентрации не инкапсулированного Ц-С.

Общую концентрацию Ц-С в ЛС-Ц ( $C_{total}$ ) количественно определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре Shimadzu UV1800 (Япония) используя УФ спектр поглощения разведенной эмульсии ЛС-Ц в диапазоне 400–560 нм (рис. 1).

Определение «свободного» Ц-С ( $C_{free}$ ) проводили методом гель-хроматографии [12].

Использовали хроматограф Shimadzu, колонка хроматографическая размером Tricorn 5/200 column (Ge Healthcare), заполненную сорбентом "superose 12", подвижная фаза (4,515 г/л  $KH_2PO_4$ ) рН до 6,0 (2 М NaOH); скорость подвижной фазы 0,5 мл/мин; детектирование при длине волны 409 нм; температура колонки 25 °С.

Поочередно хроматографировали растворы субстанции Ц-С и ЛС-Ц.

Степень инкапсуляции (ЕЕ) рассчитывали по формуле

$$EE \% = [(C_{total} - C_{free}) / C_{total}] \times 100$$

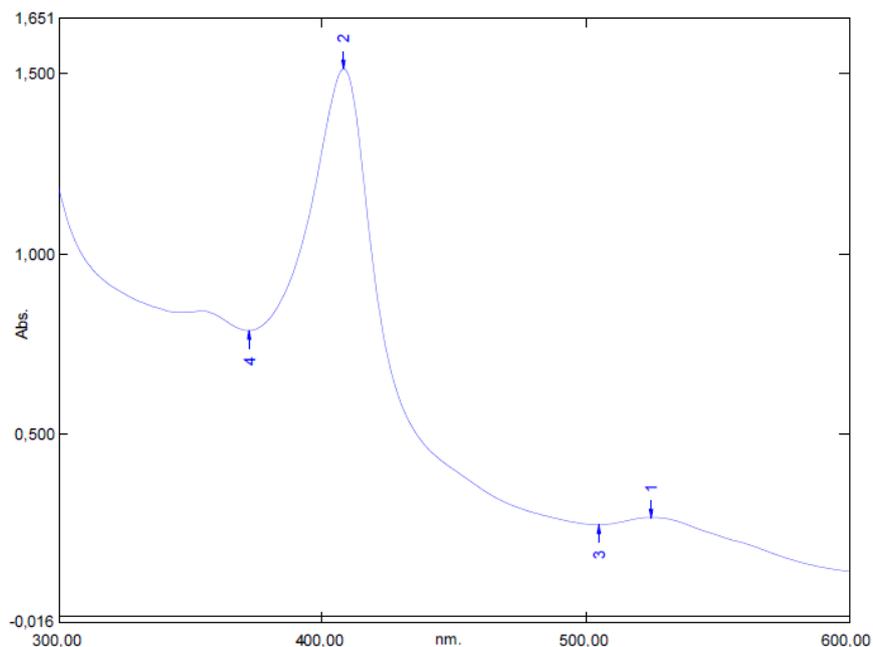


Рис. 1. УФ-спектр раствора ЛС-Ц

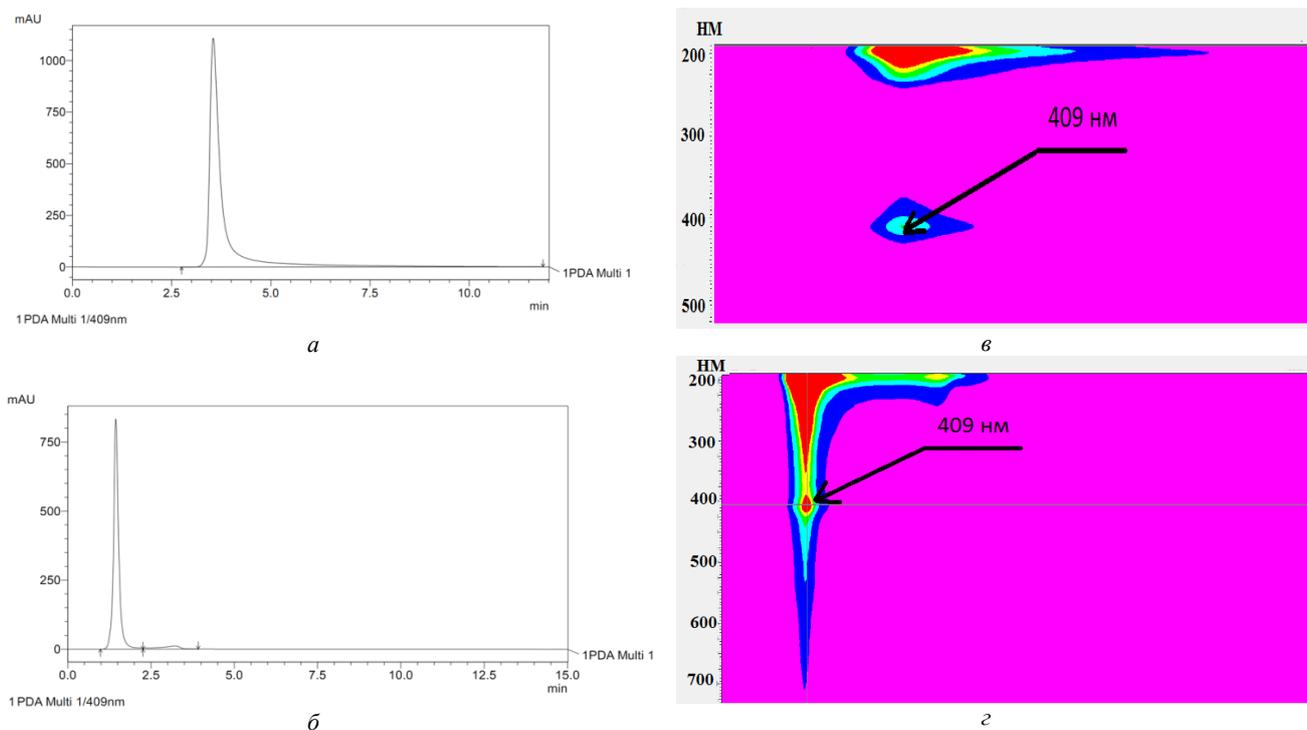


Рис. 2. Хроматограммы растворов стандарта Ц-С и ЛС-Ц; *a* – хроматограмма раствора стандарта цитохрома С, 409 нм; *б* – хроматограмма липосом с цитохромом С 409 нм; *в* – хроматограмма раствора стандарта цитохрома С, 200–800 нм; *г* – хроматограмма липосом с цитохромом С, 200–800 нм

Как видно из рис. 2 пики ЛС и Ц-С имеют различные времена удерживания. Характерные максимумы УФ-спектра поглощения в областях 400–410 нм и 520–560 нм наблюдаются в спектрах пиков раствора стандарта Ц-С (200–800 нм) и ЛС-Ц (200–800 нм).

Размер частиц определяли методом динамического светорассеяния, используя Malvern zetasizer nano S (UK) рис. 3. Зависимость значений среднего размера ЛС и степени инкапсуляции от фосфолипидного состава представлены в (табл. 1).

Таким образом, результаты физико-химических исследований свидетельствуют о том, что оптимальным является соотношение ФХ: ДПФГ (1,2–4,0:1); увеличение соотношения до 5:1, как и уменьшение соотношения 1,0:0,6 приводит к значительному снижению включения Ц-С в ЛС при сохранении частиц в нанодиапазоне до 150 нм.

Полученный размер ЛС наночастиц позволяет проводить стерилизующую фильтрацию через мембранные фильтры 0,22 мкм.

## Размер. Распределение по интенсивности.

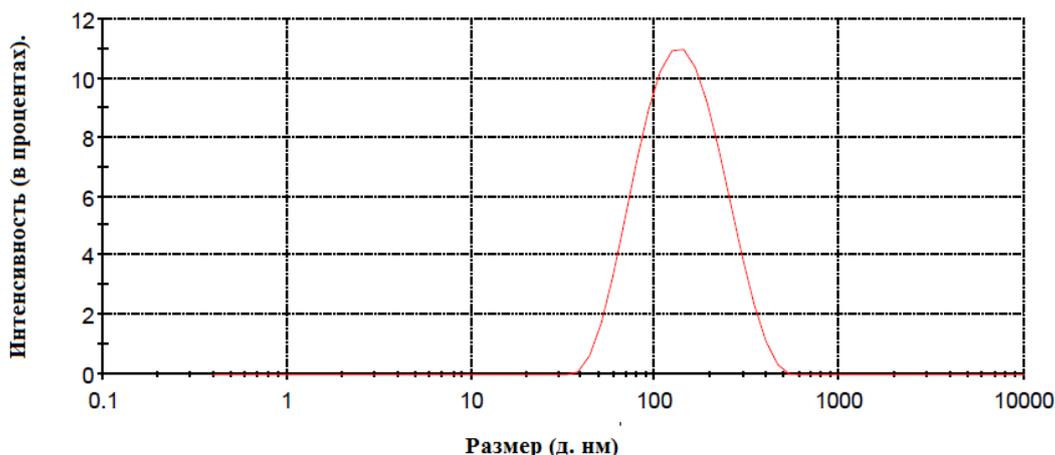


Рис. 3 Распределение размера частиц ЛС-Ц

Таблица 1

## Параметры технологии получения ЛС-Ц

Состав ЛС ФХ: ДПФГ	5,0:1,0	4,0:1,0	3,6:1,0	2,4:1,0	1,20:1,0	1,0:0,6
Средний размер ЛС	138,2 нм – 92,1 %, 37,8 нм – 7,9 %.	133,2 нм – 93,1 %, 47,8 нм – 6,9 %.	147,2 нм – 90,1 %, 30,8 нм – 9,9 %	138,2 нм – 92,1 %, 37,8 нм – 7,9 %.	132,6 нм – 93,1 %, 47,8 нм – 6,9 %	130,2 нм – 87,1 %, 47,8 нм – 12,9 %
Степень инкапсуляции	68,78 %	81,58 %	89,88 %	94,88	95,88 %	71,5 %

## 7. Выводы

1. Проведено изучение оптимального состава мембраны ЛС содержащей дипальмитоилфосфатидилглицерол и фосфатидилхолин, для дальнейшего изучения этого липосомального комплекса в качестве средства терапии в офтальмологии.

2. Установлено что оптимальным составом липосомы является соотношение фосфатидилхолина и дипальмитоилфосфатидилглицерола (1,2–4,0:1), обеспечивающее максимальную инкапсуляцию Ц-С в ЛС.

3. Разработаны методики определения степени инкапсуляции Ц-С. Инкапсуляция Ц-С составила не менее 95,0 %.

## Литература

1. Mayer, H. Objective evaluation of cataract development under treatment with cytochrome C, sodium succinate, adenosine, nicotinamide and sorbitol [Text] / H. Mayer, H. König // Fortsch. Ophthalmol. – 1987. – Vol. 84. – P. 261–264.
2. Кривцова, И. М. Цитохром С – фосфолипидный комплекс (подготовка и исследование в эксперименте) [Текст]: сб. науч. тр. / И. М. Кривцова, Н. М. Алексеева // Цитохром С и его клиническое применение. – Ленинград: СО РАМН, 1990. – С. 74–78.
3. Zhang, J. Freeze-dried liposomes as potential carriers for ocular administration of cytochrome against selenite cataract formation [Text] / J. Zhang, P. Guan, T. Wang, D. Chang, T. Jiang, S. Wang // Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 2009. – Vol. 61, Issue 9. – P. 1171–1178. doi: 10.1211/jpp.61.09.0006
4. Пат. № 2110990 RU. Липосомальная везикула с Цитохромом С. МПК А61К9/127 [Текст] / Шанская А. И., Криворучко Б. И., Бушнева Е. В. и др. – № 94027343/14; заявл. 14.07.1994; опублик. 20.05.1998.
5. Аляутдин, Р. Н. Транспорт лекарственных средств через роговицу глаза: перспективы применения липосомальных лекарственных форм [Текст] / Р. Н. Аляутдин, И. Н. Иежица, Р. Агарвал // Вестник офтальмологии. – 2014. – Т. 130, № 4. – С. 117–122.
6. Липосомальні препарати [Текст]. – Державна Фармакопея України 2.0. – Х.: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – С. 1036–1038.
7. Liposome drug products. Chemistry, manufacturing, and controls; Human pharmacokinetics and bioavailability; and labeling documentation. Guidance for industry [Electronic resource]. – U.S. Department of health and human services food and drug administration center for drug evaluation and research (CDER). FDA, 2015. – Available at: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidanceregulatoryinformation/guidances/ucm070570.pdf>
8. Пат. № 44318 UA. Спосіб одержання липосомального цитохрому С. МПК А61К9/00 [Текст] / Іванова Н. М. – № u200905288; заявл. 27.05.2009; опубл. 25.09.2009, Бюл. № 18.
9. Gorbenko, G. P. Cytochrome c Interaction with Cardiophilin/Phosphatidylcholine Model Membranes: Effect of Cardiophilin Protonation [Text] / G. P. Gorbenko, J. G. Molotkovsky, P. K. J. Kinnunen // Biophysical Journal. – 2006. – Vol. 90, Issue 11. – P. 4093–4103. doi: 10.1529/biophysj.105.080150

10. Mohn, E. S. Interactions of Cytochrome c with N-Acylated Phosphatidylethanolamine Lipids [Text] / E. S. Mohn, J.-M. Lee, C. Beaver, G. Tobbe, S. M. McCarthy, E. O'Neil et. al. // The Journal of Physical Chemistry A. – 2014. – Vol. 118, Issue 37. – P. 8287–8292. doi: 10.1021/jp502063e

11. Пат. № 022183 Евразийское патентное ведомство. Способ получения липосомальной формы цитохрома С [Текст] / Шоболов Д. Л., Краснопольский Ю. М., Ульянов А. М. и др.; патентовладелец ООО «ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВ». – № 201201592; заявл. 30.11.2012; опублик. 24.12.2015. – 9 с.

12. Кацай, О. Г. Розроблення та валідація методики визначення ступеня інкапсуляції цитохрому С у ліпосомах [Текст] / О. Г. Кацай, В. В. Прохоров, Г. С. Григор'єва, Ю. М. Краснопольський // Фармацевтичний журнал. – 2016. – № 5. – С. 69–75.

Дата надходження рукопису 10.05.2017

**Кацай Алексей Григорьевич**, аспирант, кафедра заводской технологии лекарств, Национальный фармацевтический университет, ул. Пушкинская, 53, г. Харьков, Украина, 61002  
E-mail: alexkat-1@yandex.ru

**Рубан Елена Анатольевна**, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой, кафедра заводской технологии лекарств, Национальный фармацевтический университет, ул. Пушкинская, 53, г. Харьков, Украина, 61002  
E-mail: ruban\_elen@ukr.net

**Краснопольский Юрий Михайлович**, доктор фармацевтических наук, профессор, кафедра биотехнологии, биофизики и аналитической химии, Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт», ул. Кирпичёва, 2, г. Харьков, Украина, 61002  
E-mail: biotech\_ntu\_khpi@ukr.net

УДК 615.1:615.011:615.46:621.7/.9(083.75)

DOI: 10.15587/2519-4852.2017.109071

## НОРМАТИВНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА, КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ТА БЕЗПЕЧНОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ НА ОСНОВІ НАНОМАТЕРІАЛІВ

© С. Б. Білоус, Т. Г. Калинюк

**Мета.** Аналіз українських нормативних документів щодо лікарських засобів на основі наноматеріалів та вивчення міжнародного досвіду з питань їх розробки, контролю якості та безпечності.

**Методи.** Використано методи інформаційного пошуку та аналізу даних літератури.

**Результати.** Проведено аналіз Державної фармакопеї України, наказів МОЗ України та інших українських нормативних документів щодо лікарських засобів на основі наноматеріалів, а також нормативно-правової бази ЄС щодо нанотехнологій та наноматеріалів. Обґрунтовано необхідність розробки та затвердження в Україні нормативно-правової бази з щодо лікарських засобів на основі наноматеріалів.

**Висновки.** Питання доцільності опрацювання нормативно-правової бази створення лікарських засобів на основі наноматеріалів в Україні є беззаперечним. У цьому напрямку вже зроблені перші кроки, однак питання ще далеко від вирішення. Відсутність нормативних вимог до виробництва та контролю якості і безпечності лікарських засобів з наноматеріалами ускладнює їх розробку та унеможливорює впровадження у виробництво

**Ключові слова:** наноматеріали, нанотехнології, лікарські засоби, нормативні документи, контроль якості, безпечність, стандарти

### 1. Вступ

Станом на 2017 рік в Україні значна кількість лікарських засобів на основі наноматеріалів розробляється і знаходиться на стадії доклінічних досліджень. Для їх подальшого впровадження у виробництво першочергового вирішення потребує проблема розробки, гармонізації та імплементації законодавчо врегульованої нормативно-правової та методичної бази, яка дозволить виготовляти якісну та безпечну продукцію.

### 2. Постановка проблеми у загальному вигляді, актуальність теми та її зв'язок із важливими науковими чи практичними питаннями

У зв'язку з неврегульованістю нормативної бази, наноматеріали на даний час активно запроваджуються у медицину не в якості лікарських засобів, а в якості виробів медичного призначення та косметичних продуктів, так як для них не вимагається проведення якісного та кількісного аналізу компонентів, а лише проведення санітарно-гігієнічної експертизи.