

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-66-73
УДК 615.4; 544.77.022; 544.77.023.5; 544.77.03

Оценка влияния технологических факторов на стабильность липосом фотосенсибилизатора фталоцианинового ряда

Т. А. Тимофеева^{1*}, М. В. Дмитриева¹, Л. Л. Николаева^{1,2}, О. Л. Орлова¹, Н. А. Оборотова¹,
А. П. Полозкова¹, И. И. Краснюк²

1 – ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Россия; г. Москва, Каширское шоссе, д. 24
2 – ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8

*Контактное лицо: Тимофеева Таисия Анатольевна. E-mail: taisiyatim@yandex.ru. Тел.: 8 (499) 612 81 86

ORCID: М. В. Дмитриева – 0000-0001-6740-5692; Л. Л. Николаева – 0000-0001-8003-8241; Н. А. Оборотова – 0000-0002-6986-3942

Researcher ID: М. В. Дмитриева – H-7433-2018; Л. Л. Николаева – C-8929-2018; О. Л. Орлова – H-7310-2018; Н. А. Оборотова – H-7299-2018; А. П. Полозкова – H-7354-2018

Статья получена: 01.03.2019. Статья принята к печати: 23.04.2019

Резюме

Введение. Липосомальные технологии нашли широкое применение в медицине и косметологии как системы доставки диагностических и лекарственных средств и биологически активных веществ. Несомненную практическую значимость на этапе разработки липосомального препарата представляют характеристика и оценка устойчивости получаемого продукта, причем изучению последней уделено особое внимание. Существенным образом на стабильность липосом влияют способы их получения, поэтому весьма актуальным является изучение влияния технологических факторов на свойства продукта на различных этапах получения липосом. Настоящая статья посвящена исследованию зависимости качества липосом, нагруженных фталоцианиновым фотосенсибилизатором – тиосенсом, от условий их получения.

Цель. Выявление влияния различных технологических факторов на показатели стабильности липосомальной формы фотосенсибилизатора тиосенса.

Материалы и методы. С этой целью проводили анализ среднего размера, полидисперсности и дзета (ζ)-потенциала липосом тиосенса, получаемых на стадии гидратации липидной пленки, фильтрации липосомальной дисперсии, ее экструзии, гомогенизации, ультразвуковой обработке и лиофилизации.

Результаты и обсуждение. В ходе получения липосомального препарата можно производить различные изменения условий в рамках технологического процесса. На каждом этапе получения липосомальной формы существует множество критических точек и параметров, которые необходимо строго отслеживать и контролировать. В ходе работы проведена оценка влияния технологических факторов на стабильность липосомальных промежуточных и готового продуктов. Определены условия наиболее эффективной гидратации с образованием стабильной дисперсии многослойных липосом тиосенса и оптимального метода их измельчения. Также показано, что образующиеся после регидратации лиофилизата липосомы более однородны по размеру и имеют наиболее высокое значение ζ -потенциала в сравнении с нелиофилизированной липосомальной дисперсией.

Заключение. На примере липосом фталоцианинового фотосенсибилизатора тиосенса показано влияние различных технологических факторов на показатели стабильности данной наноструктуры, поэтому несомненную практическую значимость на стадии разработки и получения липосомального препарата представляет характеристика и оценка устойчивости полученного продукта по 3 основным показателям – размеру везикул, индексу полидисперсности и ζ -потенциалу.

Ключевые слова: технологические факторы, стабильность, липосомы, размер, дзета-потенциал, индекс полидисперсности, тиосенс.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Тимофеева Т. А., Дмитриева М. В., Николаева Л. Л., Орлова О. Л., Оборотова Н. А., Полозкова А. П., Краснюк И. И. Оценка влияния технологических факторов на стабильность липосом фотосенсибилизатора фталоцианинового ряда. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(2): 66–73.

Assessing the Impact of Technological Factors on the Stability of Liposomes the Photosensitizer Phthalocyanine Series

Т. А. Timofeeva^{1*}, М. В. Dmitrieva¹, Л. Л. Nikolaeva^{1,2}, О. Л. Orlova¹, Н. А. Oborotova¹,
А. П. Polozkova¹, I. I. Krasnyuk²

1 – N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, 24, Kashirskoe Sh., Moscow, 115478, Russia
2 – I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

*Corresponding author: Taisiya A. Timofeeva. E-mail: taisiyatim@yandex.ru. Tel.: 8 (499) 612 81 86

ORCID: М. В. Dmitrieva – 0000-0001-6740-5692; Л. Л. Nikolaeva – 0000-0001-8003-8241; Н. А. Oborotova – 0000-0002-6986-3942

Researcher ID: М. В. Dmitrieva – H-7433-2018; Л. Л. Nikolaeva – C-8929-2018; О. Л. Orlova – H-7310-2018; Н. А. Oborotova – H-7299-2018; А. П. Polozkova – H-7354-2018

Received: 01.03.2019. Accepted: 23.04.2019

Abstract

Introduction. Liposomal technologies are widely used in medicine and cosmetology as a delivery system for diagnostic and medicinal products and biologically active substances. The undoubted practical importance at the stage of development of a liposomal preparation is represented by the characteristic and assessment of the sustainability of the obtained product, and special attention is paid to the study of the latter. Essentially, the methods for their preparation affect the stability of liposomes; therefore, the study of the influence of technological factors on the properties of the product at various stages of the preparation of liposomes is very important. This article is devoted to the study of the dependence of the quality of liposomes loaded with a phthalocyanine photosensitizer – thiosens, on the conditions of their production.

Aim. Detection of the influence of various technological factors on the stability indicators of the liposomal form of the thiosens photosensitizer.

Materials and methods. For this purpose, an analysis of the average size, polydispersity and zeta (ζ) potential of the liposomes of thiosens obtained at the stage of hydration of the lipid film, filtration of the liposomal dispersion, its extrusion, homogenization, ultrasonic treatment, and lyophilization was carried out.

Results and discussion. During the preparation of a liposomal preparation, various changes in conditions can be made within the framework of the technological process. At each stage of obtaining a liposomal form, there are many critical points and parameters that must be strictly monitored and controlled. In the course of the work, the influence of technological factors on the stability of liposomal intermediate and finished products was assessed. The conditions of the most effective hydration with the formation of a stable dispersion of multilayer liposomes of thiosens and the optimal method of their grinding have been determined. It was also shown that liposomes formed after rehydration of the lyophilisate are more uniform in size and have the highest ζ -potential value in comparison with non-lyophilized liposomal dispersion.

Conclusion. Using the example of a thiosens phthalocyanine photosensitizer liposomes, the influence of various technological factors on the stability of this nanostructure is shown, therefore, the characteristic and assessment of the sustainability of the resulting product according to 3 main indicators – vesicle size, polydispersity index, and ζ -potential are of undoubted practical importance.

Keywords: technological factors, stability, liposomes, size, zeta-potential, polydispersity index, thiosens.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Timofeeva T. A., Dmitrieva M. V., Nikolaeva L. L., Orlova O. L., Oborotova N. A., Polozkova A. P., Krasnyuk I. I. Assessing the impact of technological factors on the stability of liposomes the photosensitizer phthalocyanine series. *Drug development & registration*. 2019; 8(2): 66–73.

ВВЕДЕНИЕ

Многофункциональность липосом позволяет рассчитывать на их успешное применение в терапии различных патологий, а создание липосомальных форм препаратов является актуальной задачей отечественной фармации. Однако существенным ограничением по внедрению липосомальных препаратов для широкого клинического применения является отсутствие их промышленного производства, связанное с их особенностями и сложностями технологии получения. Липосомы чувствительны к любым колебаниям внешних условий, так как относятся к коллоидным дисперсным системам и являются термодинамически неустойчивыми структурами, что обуславливает их стремление к агрегации частиц и формированию более крупных структур. Данное явление, в свою очередь, может привести к изменению фармакологических свойств препарата.

В 2018 г. FDA опубликовало новое руководство по липосомальным препаратам, в котором представила окончательные рекомендации по их производству, в том числе по химическим аспектам и контролю качества на производстве, изучению фармакокинетики и биодоступности и маркировке данных препаратов. В руководстве FDA ссылается на принципы Quality-by-Design в соответствии с ICHQ8(R2) «Фармацевтическая разработка», где учитываются критические факторы – критические характеристики качества, которые представляют собой физические, химические, биологические и микробиологические свойства продукта. Рекомендуется описание отдельных операций с уточнением технологических режимов. Технологические параметры должны быть обоснованы данными фармацевтических исследований. В течение процесса разработки липосомального продукта должен быть обеспечен соответствующий контроль качества. Примерами технологических параметров, которые могут повлиять на свойства липосом, являются: сила трения, давление, pH, температура, параметры лиофилизации,

время хранения (которое зависит от объема произведенной партии) и т.д. [1].

Таким образом, важное место в процессе разработки липосомального препарата занимает исследование свойств полупродуктов и оценка их устойчивости на различных стадиях технологического процесса.

Как правило, для характеристики стабильности липосомального препарата используют 3 основных показателя – размер везикул, индекс полидисперсности и дзета- (ζ) -потенциал [2–4]. Размер везикул является важным параметром, который определяет механизм взаимодействия липосомы с клеткой [5–8]. Наиболее востребованными в онкологии стали липосомы размером от 100 до 200 нм [9, 10]. Ширину распределения липосом по размерам характеризуют по индексу полидисперсности (polydispersityindex, PDI). Его значения ранжируются от 0 до 1. Чем ближе значение к 0, тем частицы более гомогенны [5, 6, 11]. ζ -потенциал является важным индикатором поверхностного заряда частиц и мерой отталкивания или притяжения между частицами. Липосомы с высоким ζ -потенциалом отталкиваются друг от друга, а с низким – агрегируют и образуют нестабильные составы [12, 13].

Целью настоящего исследования являлось выявление влияния различных технологических факторов на показатели стабильности липосомальной формы отечественного фотосенсибилизатора фталоцианинового ряда – тиосенса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы: субстанция тиосенса – тетра-3-фенилтиофталоцианина алюминия гидроксида (ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Россия), яичный фосфатидилхолин (лецитин; E PC S, Lipoid, Германия), холестерин (Sigma-Aldrich, Co., Япония), полиэтиленгликоль-2000-дистеароифосфатидилэтанолламин (ПЭГ-2000-ДСФЭ; Lipoid, Германия), сахароза ГОСТ 5833-75 (Химмед, Россия), вода очищенная ФС.2.2.0020.18, вода для инъекций ФС.2.2.0019.18, спирт этиловый 95%, ФС.2.1.0036.15 (ОАО «Флора Кавказа», Россия), хлоро-

форм (трихлорметан) стабилизированный 0,6–1,0% масс. этанола «ХЧ» (Химмед, Россия).

Материал для фильтрации и экструзии: поликарбонатные мембранные фильтры Nuclepore (Whatman, Великобритания) диаметром 25 мм, с размером пор 0,2 мкм; нейлоновые мембранные фильтры N66 диаметром 25 мм с размером пор 0,22, 0,45 и 1,2 мкм (ООО Палл Евразия, Россия); полиэфирсульфоновые фильтры «ExpressPlus®» диаметром 25 мм, с размером пор 0,22 мкм (Merck Millipore Ltd., Ирландия), фильтр из сложных эфиров целлюлозы диаметром 25 мм, с размером пор 0,22 мкм (Merck Millipore Ltd., Ирландия); поливинилиденфторидовые фильтры диаметром 25 мм, с размером пор 0,22 мкм (Merck Millipore Ltd., Ирландия).

Оборудование: весы лабораторные DL-120 (AND, Япония), весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия), роторный испаритель Heidolph Hei-VAP Advantage (Heidolph, Германия) с отгонной колбой на 2 л, экструдер Lipex TM Thermo barrel Extruder 10 мл (NorthernLipidsInc., Канада), УЗ-ванна Transsonic T310 (Elma, Германия), гомогенизатор высокого давления Microfluidizer M-110S (Microfluidics, США), дзетасайзер Nanoseries Nano-ZS 3600 (Malvern, Великобритания).

Методы

Методика получения многослойных липосом (МСЛ)

Ингредиенты липосомального бислоя (лецитин, холестерин, ПЭГ-2000-ДСФЭ) растворяют в хлороформе. К субстанции тиосенса добавляют хлороформ и помещают в УЗ ванну на 5–10 мин для ускорения процесса растворения. Полученные растворы смешивают и переносят в круглодонную колбу. Растворитель отгоняют при температуре выше температуры фазового перехода лецитина (+37±1 °С) на роторном испарителе с получением однородной полупрозрачной липидной пленки, которую затем гидратируют. Фильтруют полученную дисперсию МСЛ на экструдере через нейлоновые мембранные фильтры «Pall» с размером пор 1,2 мкм и 0,45 мкм.

Методика получения однослойных липосом (ОСЛ)

- ✓ **Экструзия.** Профильтрованную дисперсию липосом тиосенса пропускают через фильтры различных типов с размером пор 0,2–0,22 мкм с использованием экструдера под давлением 0,9–1,0 МПа.
- ✓ **УЗ-обработка.** Профильтрованную дисперсию МСЛ тиосенса в объеме 30 мл обрабатывают на УЗ ванне с частотой 20 кГц в течение 1–60 мин.
- ✓ **Гомогенизация.** Профильтрованную дисперсию МСЛ тиосенса в объеме 60 мл пропускают на гомогенизаторе под давлением 40 psig (280 кПа) в течение 1–5 мин.

Анализ стабильности образцов липосомального тиосенса

Измерение размера, ζ-потенциала, PDI липосомального тиосенса проводили с использованием анализатора Zetasizer Nano ZS.

Методика пробоподготовки образца

0,1 мл липосомальной дисперсии (лиофилизат предварительно размораживают до комнатной температуры и регидратируют 5,6 мл воды) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят водой до метки и перемешивают. Полученное разведение оставляют на 10 мин при комнатной температуре. Разведенный образец переносят в кювету из полистирола, которую помещают в ячейку анализатора и проводят измерение показателей образца. Определение каждого показателя проводят не менее трех раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время происходит смещение акцента с анализа готовой продукции на аналитический контроль производства, т.е. качество должно быть заложено в продукт и контролироваться в процессе производства [14].

Известно, что изменение технологических факторов может сказываться на качестве получаемого продукта, поэтому так важно выяснить какое влияние это изменение оказывает на характеристики и показатели стабильности.

В ходе получения липосомального препарата можно производить различные изменения условий в рамках технологического процесса (рисунок 1).

Стадия гидратации липидной пленки

Первым этапом в технологическом процессе получения липосомального препарата является получение тонкой липидной пленки. Операции *по получению хлороформного раствора компонентов липосомальной формы тиосенса и образованию липидной пленки* проводили согласно ранее разработанному методу Санаровой Е.В. [15] без вариации условий.

После формирования липидной пленки и полного удаления остатков органического растворителя проводили ее *диспергирование (гидратацию)* с получением дисперсии МСЛ тиосенса. Согласно упомянутой методике смыв липидной пленки с лекарственной субстанцией осуществляют водой для инъекций при комнатной температуре. Однако условия этой стадии могут быть подвергнуты изменениям, что может повлиять на характеристики получаемой дисперсии. При гидратации пленки необходимо учитывать ряд факторов: температуру, величину pH и ионную силу буфера, концентрацию липидов и соотношение липид / лекарственное вещество (субстанция), физико-химические свойства используемых компонентов. При этом размер образующихся везикул определяется так же интенсивностью и временем перемешивания. Необходимо отметить, что температура в процессе ресуспендирования должны быть выше температуры фазового перехода используемого липида [16]. Кроме того, к таким технологическим факторам можно от-



Рисунок 1. Этапы получения липосом тиосенса

Figure 1. The steps of obtaining liposomes of tiosen

нести значение давления в процессе смыва пленки и тип регидранта, которые и были исследованы в данной работе.

Добавление криопротектора (раствор сахарозы 10%) традиционно происходит после измельчения липосом тиосенса, однако его также можно вводить на этапе гидратации липидной пленки от чего также могут изменяться показатели стабильности дисперсии.

При обычных условиях на стадии гидратации липидной пленки наблюдается образование пены, что частично затрудняет процесс фильтрации/экструзии липосомальной дисперсии. Пенообразование вероятно обусловлено высокой концентрацией липидов в дисперсии, в частности фосфотидилхолина – 75 мг/мл. В связи с этим для решения задачи подавления пенообразования рассмотрена возможность проведения гидратации липидной пленки в условиях низкого давления (под вакуумом) – с использованием метода вакуумной дегазации.

Как известно, дегазацией называют удаление из воды газов, растворенных в ней или образующихся в процессе ее обработки. Для этого понижают давления до величины, при которой вода кипит без дополнительного подогрева в вакуумных дегазаторах, так называемая «холодная» деаэрация или вакуумная дегазация [17]. Применительно к технологии липосомальных форм, преимуществом использования вакуума при гидратации липидной пленки, помимо снижения образования пены, является удаление из дисперсии кислорода, который приводит к перекисному окислению липосомальных липидов.

В результате анализа качества дисперсий МСЛ тиосенса, полученных как с использованием вакуума (200 мбар) и без, при гидратации пленки водой для инъекций или раствором сахарозы 10% установлено, что пониженное давление оказывает положительный эффект на процесс формирования липосом (таблица 1). Образующиеся липосомы при использовании обоих режимов имели практически одинаковый размер, но дисперсия, получаемая под воздействием вакуума является однородной (гомогенной) и более стабильной – разница в значении ζ -потенциала составляет 8,2 mV. При этом липосомы, получаемые при смыве раствором сахарозы имеют меньший ζ -потенциал, а значит, не смотря на меньшие размеры и индекс полидисперсности, являются менее устойчивыми.

Стадия фильтрации

Под фильтрованием понимается процесс разделения гетерогенных систем с твердой дисперсной фазой посредством пористой перегородки (фильтра), которая пропускает жидкость (фильтрат) и задерживает взвешенные твердые частицы. Липосомальная дисперсия до фильтрации может содержать значительное количество видимых и невидимых механических частиц, которые представляют собой случайные посторонние подвижные нерастворимые частицы, в том числе фракцию «не включенного» в везикулы ЛВ, за исключением пузырьков газа.

В процессе получения липосомального тиосенса-дисперсию МСЛ фильтруют под давлением посред-

Таблица 1. Влияние вакуума на внешний вид и показатели стабильности липосомальной дисперсии при гидратации липидной пленки

Table 1. The effect of vacuum on the appearance and stability of liposomal dispersion in the hydration of the lipid film

Режим гидратации пленки		Внешний вид дисперсии	Значение ζ -потенциала, мВ	Размер липосом, нм	Значение PDI
Без сахарозы	Без вакуума	Пенистая дисперсия зеленого цвета	$-(25,7 \pm 2,5)$	959 ± 25	$0,933 \pm 0,032$
	С вакуумом (200 мбар)	Гомогенная дисперсия зеленого цвета	$-(33,9 \pm 3,1)$	1416 ± 33	$0,846 \pm 0,041$
С сахарозой	Без вакуума	Пенистая дисперсия зелено-голубого цвета	$-(25,2 \pm 2,7)$	561 ± 24	$0,700 \pm 0,052$
	С вакуумом (200 мбар)	Гомогенная дисперсия зелено-голубого цвета	$-(16,7 \pm 2,3)$	354 ± 21	$0,531 \pm 0,039$

вом пропускания в экструдере через нейлоновые мембраны с диаметром пор 1,2 и 0,45 нм. При этом наблюдается изменение основных показателей стабильности — постепенное уменьшение размера и незначительное увеличение ζ -потенциала (таблица 2).

Таблица 2. Результаты измерений основных показателей стабильности липосомальной дисперсии после пропускания через фильтры с диаметром пор 1,2 нм и 0,45 нм

Table 2. Results of measurements of the main indicators of stability of liposomal dispersion after passing through filters with a pore diameter of 1.2 nm and 0.45 nm

Показатели	До фильтрации	1,2 мкм	0,45 мкм
Значение ζ -потенциала, мВ	$-(18,0 \pm 1,8)$	$-(20,6 \pm 2,1)$	$-(20,2 \pm 1,5)$
Размер везикул, нм	855 ± 26	683 ± 22	323 ± 15
Значение PDI	$0,576 \pm 0,072$	$0,666 \pm 0,063$	$0,438 \pm 0,034$

Стадия измельчения

За стадией фильтрации дисперсии МСЛ тиосенса следует стадия их измельчения. Для измельчения липосомальных дисперсий чаще всего применяют методы экструзии и гомогенизации / микрофлюидизации; гораздо реже используют методы обработки УЗ.

С целью сравнения влияния различных методов получения ОСЛ тиосенса на устойчивость продукта оценивали показатели стабильности дисперсии, полученные при измельчении дисперсии МСЛ вышеперечисленными методами.

Экструзия

Эффективность измельчения и стабильность липосомального препарата при экструзии зависит от типа используемого фильтра и количества циклов пропускания. Экструзия липосомальной дисперсии проводилась с использованием фильтров с диаметром пор 0,2–0,22 мкм пяти типов – нейлоновых (Н), полиэфирсульфоновых (ПЭС), фильтров из сложных эфиров целлюлозы (СЭЦ), поливинилиденфторидовых (ПВДФ) и поликарбонатных (ПК). Основные показатели стабильности измерялись после первого, третьего и пятого циклов пропускания липосомальной дисперсии через

экструдер для каждого типа фильтра соответственно (таблица 3).

Из представленных данных видно, что для измельчения МСЛ тиосенса наиболее эффективно использование ПВДФ-фильтра – отмечается ступенчатое снижение размеров везикул и PDI. При использовании других типов фильтров значения данных показателей колеблются как в сторону уменьшения, так и увеличения. Однако значение ζ -потенциала выше у образца дисперсии, полученной при экструзии с Н-фильтрами. Таким образом, тип фильтра может влиять на стабильность липосомальной конструкции, что следует учитывать при подборе оптимального режима экструзии.

Гомогенизация липосомальной дисперсии тиосенса проводилась с помощью микрофлюидайзера. При использовании этого метода измельчения эффективность процесса в основном зависит от количества циклов или времени рециркуляции, в течение которого она находится в аппарате. Чтобы выяснить влияние времени циркуляции на устойчивость липосом производили отбор проб после каждого цикла и измеряли основные показатели стабильности. Результаты измерений приведены в таблице 4.

Согласно указанным данным, с увеличением времени циркуляции дисперсии в микрофлюидайзере наблюдается постепенное уменьшение размера везикул, который через 4 мин достиг минимального значения 138 нм при величине PDI 0,311. В то же время с увеличением периода циркуляции до 2 мин отмечается резкое снижение значения ζ -потенциала – на 7 мВ, однако в дальнейшем происходит постепенное его увеличение практически до первоначального значения. Таким образом, обобщая результаты эксперимента, можно сделать вывод, что гомогенизация влияет на стабильность липосомального препарата, при этом уровень воздействия определяется временем циркуляции дисперсии.

УЗ-обработка

Поскольку эффективность измельчения при УЗ-обработке в основном зависит от времени озвучивания, липосомальную дисперсию тиосенса объемом 30 мл помещали на УЗ ванну и обрабатывали в течение

Таблица 3. Результаты измерений основных показателей стабильности липосомальной дисперсии при экструзии
Table 3. Results of measurements of the main indicators of stability of liposomal dispersion during extrusion

Тип фильтра	Н			ПЭС			ПК			ПВДФ			СЭЦ		
	1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5
Количество циклов															
Значение ζ -потенциала, мВ	-(21,2±2,9)	-(18,0±1,9)	-(26,0±2,1)	-(17,0±1,9)	-(14,9±2,2)	-(14,7±1,7)	-(26,2±3,0)	-(10,2±2,1)	-(13,7±2,2)	-(22,6±2,7)	-(17,3±2,8)	-(15,1±1,8)	-(13,8±1,9)	-(19,5±1,6)	-(18,8±2,0)
Размер везикул, нм	284±16	325±15	229±10	335±20	217±11	225±10	311±17	324±12	386±21	253±16	243±14	213±8	310±21	316±18	319±17
Значение PDI	0,328±0,077	0,457±0,067	0,217±0,031	0,386±0,054	0,155±0,030	0,244±0,031	0,440±0,069	0,504±0,058	0,567±0,034	0,647±0,055	0,348±0,026	0,200±0,031	0,460±0,047	0,270±0,038	0,440±0,035

1–60 мин с отбором образцов препарата через определенные промежутки времени – 1, 5, 10, 20, 30 45 и 60 мин. Для оценки стабильности полученных образцов дисперсий проводили измерения размера липосом, PDI и ζ -потенциала, значения которых представлены в таблице 5.

Полученные результаты проведенного исследования показывают отсутствие корреляционной зависимости между временем воздействия УЗ на дисперсию и значениями показателей стабильности. Изменения значений для каждого отдельно взятого показателя носят волнообразный характер. Так, наиболее высокие значения ζ -потенциала наблюдаются спустя 1 и 45 мин от начала воздействия, а минимальные — через 30 и 60 мин. В то же время при измельчении липосом в течение 30 мин отмечается скачкообразное изменение среднего размера везикул, однако после достижения минимального значения (308 нм) происходит их рост в диаметре. Таким образом, измерение показателей стабильности для оценки устойчивости липосомальной дисперсной системы в случае измельчения везикул УЗ не является информативным.

Таким образом, обобщая данные сравнительного анализа исследуемых методов измельчения МСЛ тиосенса, можно сделать вывод, что экструзия позволяет получать наиболее стабильные дисперсии. При экструзии наблюдается наименьший размер частиц и индекс полидисперсности при самом высоком значении ζ -потенциала.

Лиофилизация

Хранение липосомального препарата в «жидком» виде сопряжено с рядом проблем, наиболее существенным из которых являются: окисление и гидролиз используемых фосфолипидов, главным образом, ненасыщенных, а также ряд физических изменений (агрегация, слияние и др.) в дисперсии. В связи с этим для стабилизации липосом наиболее широко используют метод лиофилизации [18].

Целью заключительного этапа исследования являлась оценка влияния сублимационного высушивания на устойчивость липосомального препарата путем сравнения показателей стабильности как до, так и после лиофилизации дисперсии ОСЛ тиосенса.

В качестве криопротектора при лиофилизации липосомального тиосенса использовали сахарозу, которую вводили в дисперсию после стадии измельчения до ее конечной концентрации 10%. Лиофилизацию проводили, используя методику медленного замораживания.

По результатам проведенного исследования, приведенным в таблице 6, видно, что лиофилизация способствует значительному повышению значения ζ -потенциала, сохранению размеров везикул и получению наиболее гомогенной дисперсии после регидратации лиофилизата.

Таблица 4. Результаты измерений основных показателей стабильности липосомальной дисперсии при гомогенизации

Table 4. The results of the measurements of the main indicators of the stability of the liposomal dispersion under homogenization

Показатели стабильности	Время, мин				
	1	2	3	4	5
Значение ζ -потенциала, мВ	$-(17,2 \pm 1,8)$	$-(10,2 \pm 2,7)$	$-(12,1 \pm 1,9)$	$-(16,2 \pm 1,9)$	$-(17,8 \pm 2,3)$
Размер везикул, нм	181 ± 10	158 ± 8	142 ± 5	138 ± 6	147 ± 5
Значение PDI	$0,417 \pm 0,053$	$0,439 \pm 0,041$	$0,403 \pm 0,024$	$0,311 \pm 0,025$	$0,519 \pm 0,030$

Таблица 5. Результаты измерений основных показателей стабильности липосомальной дисперсии при воздействии УЗ

Table 5. Results of measurements of the main indicators of stability of liposomal dispersion under the influence of ultrasound

Показатели стабильности	Время						
	1 мин	5 мин	10 мин	20 мин	30 мин	45 мин	60 мин
Значение ζ -потенциала, мВ	$-(24,0 \pm 3,1)$	$-(21,1 \pm 3,3)$	$-(20,1 \pm 2,5)$	$-(22,5 \pm 2,4)$	$-(18,6 \pm 2,1)$	$-(23,8 \pm 1,8)$	$-(16,5 \pm 2,2)$
Размер везикул, нм	340 ± 20	424 ± 24	322 ± 18	392 ± 19	308 ± 15	334 ± 25	354 ± 16
Значение PDI	$0,455 \pm 0,062$	$0,456 \pm 0,050$	$0,310 \pm 0,036$	$0,593 \pm 0,044$	$0,494 \pm 0,041$	$0,511 \pm 0,038$	$0,628 \pm 0,046$

Таблица 6. Показатели стабильности до и после лиофилизации липосом тиосенса

Table 6. Stability before and after lyophilization of the liposomes of tiosens

	Показатели качества		
	Размер везикул, нм	Значение PDI	Значение ζ -потенциала, мВ
До лиофилизации	229 ± 13	$0,217 \pm 0,032$	$-(26,0 \pm 3,3)$
После лиофилизации	220 ± 10	$0,180 \pm 0,020$	$-(35,0 \pm 2,3)$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На каждом этапе получения липосомального препарата существует множество критических точек и параметров, которые необходимо строго отслеживать и контролировать. В результате проведенных исследований проведена оценка влияния технологических факторов на стабильность липосомальных промежуточных и готового продуктов. Показано, что наиболее эффективная гидратация с образованием стабильной дисперсии МСЛ тиосенса проходит в условиях вакуума и с использованием в качестве регидранта воды для инъекций. В результате сравнительного анализа способов получения ОСЛ тиосенса установлено, что измельчение МСЛ целесообразнее проводить с применением методов экструзии с использованием нейлоновых фильтров с размером пор 0,22 мкм и гомогенизации, что обусловлено высокой производительностью указанных методов и сохранением стабильности липосом. Также показано, что образующиеся после регидратации лиофилизата липосомы более однородны по размеру и имеют наиболее высокое значение ζ -потенциала в сравнении с нелиофилизированной липосомальной дисперсией.

ЛИТЕРАТУРА

- New FDA Guidance on Liposomes. Available at: <https://www.gmp-compliance.org/gmp-news/new-fda-guidance-on-liposomes>.
- Matuszak J., Baumgartner J., Zaloga J. et al. Nanoparticles for intravascular applications: physicochemical characterization and cytotoxicity testing. *Nanomedicine*. 2016; 11(6): 597–616. DOI: 10.2217/nnm.15.216.
- Mahmud M., Piwoni A., Filiczak N. et al. 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. DOI:10.1371/journal.pone.0167787.
- Oskuee R. K., Mahmoudi A., Gholami L. et al. Cationic liposomes modified with polyallylamine as a gene carrier: preparation, characterization and transfection efficiency evaluation. *AdvPharmBull*. 2016; 6(4): 515–520. DOI: 10.15171/apb.2016.065.
- Kaszuba M., McKnight D., Connah M. T. et al. Measuring sub nanometre sizes dynamic light scattering. *J Nanopart Res*. 2008; 10: 823–829.
- Suhaimi S. H., Hasham R., Rosli N. A. Effects of formulation parameters on particle size and polydispersity index of orthosiphonstamineus loaded nanostructured lipid carrier. *Journal of advanced research in applied sciences and engineering technology*. 2015; 1(1): 36–39.
- Барышников А. Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов. *Вестник РАМН*. 2012; 3: 23–30.
- Дёмина Н. Б., Скатков С. А. Стратегии развития и биофармацевтические аспекты систем доставки лекарств. *Рос. Хим. Ж. (Ж. Рос. Хим. Об-ва им. Д.И. Менделеева)*. 2012; LVI(3–4): 5–10.
- Oborotova N., Treshalina H., Bashakova Z. et al. Possible application of the new lipidocytostatic D-152 in different drug formulation. *Pharmaceutski vestnic, Ljubljana*. 1997; 48: 278–279.
- Oerlemans C., Bult W., Bos M. et al. Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. *Pharm Res*. 2010; 27: 2569–2589. DOI: 10.1007/s11095-010-0233-4.
- Бабаджанянц Л. К., Войтылов А. В., Войтылов В. В., Трусов А. А. Анализ полидисперсности макромолекулярных и нанодисперсных систем электрооптическими методами. *Высокомолекулярные соединения. Серия С*. 2010; 52(5): 1–12.
- Rejman J., Oberle V., Zuhorn I. S., Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J*. 2004; 377(1): 159–69. DOI: 10.1042/BJ20031253.
- Riaz M. Liposomes preparation methods. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1996; 19(1): 65–77.
- Шанская А. И., Пучкова С. М., Яковлева Т. Е. Липосомы – перспективная форма лекарственных препаратов. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2011; 3(37): 100–104.
- Санарова Е. В. Автореферат «Создание и биофармацевтическое изучение новой липосомальной лекарственной формы тиосенса для фотодинамической терапии». 2013; 24.
- Краснопольский Ю. М., Степанов А. Е., Швецов В. И. и др. Липидная технологическая платформа для создания новых лекарственных форм и транспорта активных фармацевтических субстанций. *Биофармацевтический журнал*. 2011; 3(2): 10–18.
- Абиев Р. Ш., Васильев М. П., Доильницын В. А. Исследование процесса вакуумной дегазации воды в вихревом струйном аппарате. *Известия СПбГТИ(ТУ). I. Химия и химическая технология. Процессы и аппараты*. 2015; 28: 64–69.

18. Быковский С. Н., Василенко И. А., Демина Н. Б. и др. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. М., 2015; 70–183.

REFERENCES

1. New FDA Guidance on Liposomes. Available at: <https://www.gmp-compliance.org/gmp-news/new-fda-guidance-on-liposomes>.
2. Matuszak J., Baumgartner J., Zaloga J. et al. Nanoparticles for intravascular applications: physicochemical characterization and cytotoxicity testing. *Nanomedicine*. 2016; 11(6): 597–616. DOI: 10.2217/nnm.15.216.
3. Mahmud M., Piwoni A., Filiczak N. et al. 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. DOI:10.1371/journal.pone.0167787.
4. Oskuee R. K., Mahmoudi A., Gholami L. et al. Cationic liposomes modified with polyallylamine as a gene carrier: preparation, characterization and transfection efficiency evaluation. *AdvPharmBull*. 2016; 6(4): 515–520. DOI: 10.15171/apb.2016.065.
5. Kaszuba M., McKnight D., Connah M. T. et al. Measuring sub nanometre sizes dynamic light scattering. *J Nanopart Res*. 2008;10:823–829.
6. Suhaimi S. H., Hasham R., Rosli N. A. Effects of formulation parameters on particle size and polydispersity index of orthosiphonstamineus loaded nanostructured lipid carrier. *Journal of advanced research in applied sciences and engineering technology*. 2015; 1(1): 36–39.
7. Baryshnikov A.Yu. Nanostructured liposomal systems as a means of delivery of anticancer drugs. *Vestnik RAMS*. 2012; 3: 23–30 (In Russ.).
8. Demina N. B., Skatkov S. A. Development strategies and biopharmaceutical aspects of drug delivery systems. *ROS. Chem. J. (J. ROS. Chem. About them. D.I. Mendeleev)*. 2012; LVI(3–4): 5–10 (In Russ.).
9. Oborotova N., Treshalina H., Bashakova Z. et al. Possible application of the new lipidocytostatic D-152 in different drug formulation. *Pharmaceutski vestnik, Ljubljana*. 1997;48:278–279.
10. Oerlemans C., Bult W., Bos M. et al. Polimeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. *Pharm Res*. 2010; 27: 2569–2589. DOI: 10.1007/s11095-010-0233-4.
11. Babadzanjanz L. K., Voitylov A. V., Vojtylov V. V., Trusov A. A. Analysis of polydispersity of macromolecular and nano-dispersed systems; electro-optical methods. *High molecular compounds, Series S*. 2010; 52(5): 1–12 (In Russ.).
12. Rejman J., Oberle V., Zuhorn I. S., Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J*. 2004; 377(1): 159–69. DOI: 10.1042/BJ20031253.
13. Riaz M. Liposomes preparation methods. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1996; 19(1): 65–77.
14. Shanskaya A. I., Puchkova S. M., Yakovleva T. E. Liposomes – a promising form of drugs. *Medicine of extreme situations*. 2011; 3(37): 100–104 (In Russ.).
15. Sanarova E.V. Abstract of «Development and biopharmaceutical study of a new liposomal dosage form of tirosens for photodynamic therapy». 2013; 24 (In Russ.).
16. Krasnopolsky Yu. M., Stepanov A. E., Shvets V. I. et al. Lipid technological platform for the creation of new dosage forms and transport of active pharmaceutical substances. *Biopharmaceutical journal*. 2011; 3(2): 10–18 (In Russ.).
17. Abiyev R.Sh., Vasiliev M.P., Doilnitsyn V.A. Research of process of vacuum degassing of water in a vortex jet device. *Proceedings of the Spbsti(TU).I. Chemistry and chemical technology. Processes and devices*. 2015;28:64–69 (In Russ.).
18. Bykovsky S. N., Vasilenko I. A., Demina N. B. Pharmaceutical development: concept and practical recommendations. М., 2015; 70–183 (In Russ.).