

ISSN 2311-4495
ISSN 2410-5155 (Online)
УДК 577.352.2+615.45
<https://doi.org/10.18705/2311-4495-2025-12-6-562-575>

Сравнение способов постобработки липосомальных препаратов с применением различных методов

А. И. Никифоров^{1,2}, И. Е. Ануфриев^{1,2,3}, В. В. Трушлякова²,
Р. Г. Валеев⁴, Д. В. Королев^{1,5}

Контактная информация:

Королев Дмитрий Владимирович,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
пр. Пархоменко, д. 15, лит. Б,
Санкт-Петербург, Россия, 194156.
E-mail: dimon@cardioprotect.spb.ru

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» имени
В. И. Ульянова (Ленина)», Санкт-Петербург, Россия

³ Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Национальный
исследовательский университет ИТМО», Санкт-Петербург, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского
отделения Российской академии наук», Ижевск, Россия

⁵ Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет имени академика
И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Актуальность. Размер липосом и индекс полидисперсности — важнейшие факторы, определяющие дальнейшее использование наночастиц. Традиционные методы синтеза не позволяют создать липосомы требуемых размеров и однородности, с такой целью проводится их постобработка: ультразвуковая или экструзионная. **Цель.** Сравнить два метода постобработки липосом: ультразвукового и экструзионного. Провести сравнение эффективности работы двух разных экструдеров: Liposofast LF-50 и экструдера собственной разработки. Провести сравнение эффективности трех мембран из различных материалов: поликарбоната, полиэфирсульфона и пористого анодного оксида алюминия при экструзионном методе постобработки. **Материалы и методы.** Для синтеза липосом использовались коммерчески доступные реактивы: фосфолипиды, холестерин, витамин Е (все — Sigma Aldrich, Германия). Физико-химические характеристики липосом изучались с помощью Zetasizer Ultra (Malvern Instruments, UK). Ультразвуковая постобработка проводилась с помощью диспергатора УЗГ13 — 0,1/22 (Россия), экструзионная обработка выполнялась с помощью одного из двух экструдеров: Liposofast LF-50 (Avestin, Канада) и экструдера

собственной разработки («Нанотехнологии»). Использовались мембраны: поликарбонатные (ПК) 200 нм (Nuclepore, Whatman), полиэфирсульфонные (ПЭС) 200 нм (ФМПЭС-0,20, АО «Владисарт») и опытные образцы мембран на основе пористого анодного оксида алюминия (ПАОА). Для определения различий в морфологии мембраны исследовались при помощи растрового электронного микроскопа Quanta Inspect (FEI, США). **Результаты.** Наиболее однородными являются мембраны на основе ПК, а наименее однородными — ПЭС. Все мембраны имеют заявленный диаметр пор 200 нм, однако только для ПАОА этот параметр близок к реальному значению. Наибольшей пористостью обладают мембраны ПАОА, наименьшей — поликарбонатные. Для прохождения липосомального коллоидного раствора через мембраны необходимо разное давление: для ПЭС мембраны достаточно 1,5–2 атм, для ПК — 5 атм, ПАОА — 4–6 атм. **Заключение.** Сравнение существующих способов гомогенизации липосом показало преимущество метода экструзии. Разработанный авторами экструдер не уступает коммерческой версии. Показана эффективность мембран ПАОА по сравнению с коммерческими аналогами.

Ключевые слова: липосомальные препараты, гомогенизация, постобработка, соникация, экструзия, мембранные фильтры

Для цитирования: Никифоров А.И., Ануфриев И.Е., Трушлякова В.В. и др. Сравнение способов пост-обработки липосомальных препаратов с применением различных методов. *Трансляционная медицина*. 2025;12(6):562-575. <https://doi.org/10.18705/2311-4495-2025-12-6-562-575>; <https://elibrary.ru/XIPFYA>

Comparison of post-processing methods for liposomal preparations using different techniques

Alexey I. Nikiforov^{1, 2}, Ilya E. Anufriev^{1, 2, 3},
Valentina V. Trushlyakova², Rishat G. Valeev⁴, Dmitrii V. Korolev^{1, 5}

Corresponding author:

Dmitrii V. Korolev,
V.A. Almazov NMRC,
15 B Parchomenko ave., St. Petersburg,
Russia, 194156.
E-mail: dimon@cardioprotect.spb.ru

¹ Federal State Budgetary Institution "V.A. Almazov National Medical Research Centre" of the Ministry of Health of the Russian Federation, , St. Petersburg, Russia

² Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI", St. Petersburg, Russia

³ ITMO University, St. Petersburg, Russia

⁴ Udmurt Federal Research Centre of the Ural Branch of the RAS, Izhevsk, Russia

⁵ Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

Abstract

Background. Liposome size and polydispersity index are key factors determining the subsequent use of nanoparticles. Traditional synthesis methods do not allow the creation of liposomes of the required size and homogeneity; therefore, post-processing is performed using ultrasound or extrusion. **Objective.** To compare two methods of liposome post-processing: ultrasound and extrusion. To compare the efficiency of two different extruders: Liposofast LF-50 and a proprietary extruder. To compare the efficiency of three membranes made of different materials: polycarbonate, polyether-sulfone, and porous anodic alumina, using the extrusion post-processing method. **Materials and Methods.** Commercially available reagents were used for liposome synthesis: phospholipids, cholesterol, and vitamin E (all from Sigma Aldrich, Germany). The physicochemical properties of liposomes were studied using a Zetasizer Ultra (Malvern Instruments, UK). Ultrasonic post-processing was performed using a UZG13-0.1/22 disperser (Russia), extrusion processing was carried out using one of two extruders: Liposofast LF-50 (Avestin, Canada) and an extruder of our own design (Nanotechnologies).

The following membranes were used: polycarbonate (PC) 200 nm (Nuclepore, Whatman), polyethersulfone (PES) 200 nm (FMPES-0.20, Vladisart), and experimental membrane samples based on porous anodic aluminum oxide (PAO). To determine differences in membrane morphology, they were examined using a Quanta Inspect scanning electron microscope (FEI, USA). **Results.** PC-based membranes are the most uniform, while PES is the least uniform. All membranes have a declared pore diameter of 200 nm, but only for PAOA is this parameter close to the actual value. PAOA membranes have the highest porosity, while polycarbonate membranes have the lowest. Different pressures are required for the liposomal colloidal solution to pass through the membranes: 1.5–2 atm is sufficient for PES membranes, 5 atm for PC membranes, and 4–6 atm for PAOA membranes, which significantly affects the extrusion rate. **Conclusion.** A comparison of existing liposome homogenization methods demonstrated the advantage of extrusion. The extruder developed by the authors is comparable to a commercial version. The effectiveness of PAOA membranes compared to commercial analogues is demonstrated.

Keywords: liposomal preparations, homogenization, post-processing, sonication, extrusion, membrane filters

For citation: Nikiforov AI, Anufriev IE, Trushlyakova VV, et al. Comparison of post-processing methods for liposomal preparations using different techniques. *Translational Medicine*. 2025;12(6):562-575. <https://doi.org/10.18705/2311-4495-2025-12-6-562-575>; <https://elibrary.ru/XIPFYA>

Список сокращений: DLS — динамическое рассеяние света, ELS — электрофоретическое рассеяние света, FWHM — ширина на полувысоте, ИПД — индекс полидисперсности, ИЦЗ — индоцианин зеленый, ЛПС — липосомы, ПАОА — пористый анодный оксид алюминия, ПК — поликарбонат, ПЭС — полиэфирсульфон, РЭМ — растровый электронный микроскоп, ФЛП — фосфолипиды, ХС — холестерин.

Введение

За последние несколько десятилетий разработано множество методов синтеза липосом. Однако практически все методы имеют весомые недостатки: на первой стадии липосомы получаются многослойными и имеют большой разброс по размерам. Для обеспечения высокой монодисперсности образца используются различные методы постобработки. На данный момент самые часто применяемые и доступные — ультразвуковая обработка (сонация) и экструзия под высоким давлением [1].

Ультразвуковая обработка липосом заключается в воздействии на суспензию звуковыми волнами высокой частоты [2]. В результате воздействия липидная мембрана разрывается и происходит переформирование липосом, что способствует уменьшению их среднего размера. Для ультразвуковой обработки, как правило, используют либо ультразвуковой диспергатор, либо ультразвуковую ванну. Первый метод гораздо проще и дешевле, однако имеет ряд недостатков. Во-первых, наконечник диспергатора непосредственно погружается в раствор, что может привести к загрязнению липосомальной суспензии, а это недопустимо при использовании полученного

раствора в медицинских целях, например для инъекционных лекарственных форм. Во-вторых, во время ультразвуковой обработки раствор достаточно сильно нагревается, из-за чего возможны окисление и гидролиз липидов [3]. Соответственно, емкость с образцом нужно держать в холодной воде.

Использование ультразвуковой ванны нейтрализует оба недостатка: температуру регулировать гораздо проще, а обрабатываемый раствор находится в стерильных условиях. Однако такой подход дороже и сложнее в реализации. Кроме того, для получения лучших результатов необходимо располагать исследуемую суспензию в инертной атмосфере [3].

Метод экструзии заключается в многократном пропускании липосомального раствора под давлением через мембранный фильтр, размеры пор которого равны конечному размеру липосом [4]. Как правило, для получения однородного раствора везикул необходимо пропустить липосомы через экструдер несколько раз. В процессе экструзии образуются однослойные везикулы вытянутой цилиндрической формы [5], это связано с силами сдвига, вызванными давлением во время гомогенизации. Впоследствии везикулы становятся сферическими [6]. По своей сути, при экструзии осуществляется ультрафильтрация раствора [7], так как он проходит через макропористую мембрану под давлением, которое может быть различным. Например, в работе [8] рекомендуется давление 0.1 МПа. За счет этого повышается качество полученного продукта, так как происходит фильтрация раствора от ненужных механических частиц [9], очистка от лекарственного вещества, не попавшего в липосомы, и стерилизация продукта, если диаметр пор менее 0,22 мкм.

Существует несколько конструкций экструдеров [10], самый простой из них — ручной. Он представляет собой систему из двух соединенных между собой шприцов, которые пропускают липосомальный раствор через мембрану, находящуюся между ними. Существуют автоматические экструдеры прерывного типа [11], то есть не требующие приложения человеческих усилий для получения продукта. Они могут пропускать липосомы через мембрану только один раз, после этого необходимо снова закладывать раствор в экструдер для продолжения гомогенизации.

Главной частью экструдера, благодаря которой возможны перечисленные ранее преимущества методики, является мембрана [12]. Мембраны, используемые в экструзии, как правило, изготавливают из поликарбоната, полиэфирсульфона или нейлона [13], реже из других материалов. Поры в них обладают цилиндрической формой, и многослойные везикулы, проходя через них, распадаются на частицы меньшего размера.

Целью работы являлось сравнение двух методов постобработки липосом: ультразвукового и экструзионного; сравнение эффективности работы двух разных экструдеров: Liposofast LF-50 и экструдера собственной разработки; сравнение эффективности трех мембран из различных материалов: поликарбоната, полиэфирсульфона и пористого анодного оксида алюминия при экструзионном методе постобработки.

Материалы и методы

Для синтеза липосом использовали следующие материалы: фосфотидилхолин L- α -Phosphatidylcholine

(Type II-S, 14–29 % choline basis, Sigma Aldrich, USA), холестерин (Sigma Grade, ≥ 99 %, Sigma Aldrich, USA), хлороформ (ЧДА, АО «Ленреактив», Россия), витамин E DL- α -Tocopherol acetate ≥ 96 % (HPLC, Sigma Aldrich, USA).

Синтез липосом осуществляли с помощью метода гидратации/регидратации тонкой пленки. Суть метода заключалась в упаривании раствора фосфолипидов на дне круглодонной колбы. Для этих целей использовали ротационный испаритель. Схема синтеза представлена на рисунке 1.

Синтез липосом осуществляли по ранее отработанной авторами методике [14]. Навеску фосфотидилхолина в количестве 75 мг и 15 мг холестерина растворяли в 15 мл хлороформа, добавляли 10 мкл витамина E и перемещали в круглодонную колбу на 2000 мл. Растворитель упаривали на ротационном испарителе (RE-5000 Rotary Evaporator, Китай) под вакуумом (N 810 LABOPORT, KNF Neuberger, GmbH) без нагревания до образования тонкой пленки. Тонкую липидную пленку досушивали при температуре водяной бани 45 ± 5 °C до состояния прозрачности. Далее гидратировали высушенную пленку приготовленным гидратирующим раствором с веществом, необходимым для инкапсулирования в липосомы при непрерывном перемешивании. Процесс гидратации продолжали до полного смыывания липидной пленки со стенок колбы.

В качестве инкапсулированного вещества в работе использовали индоцианин зеленый (ИЦЗ) — циановый краситель, применяемый в медицинской диагностике для определения функций и кровотока

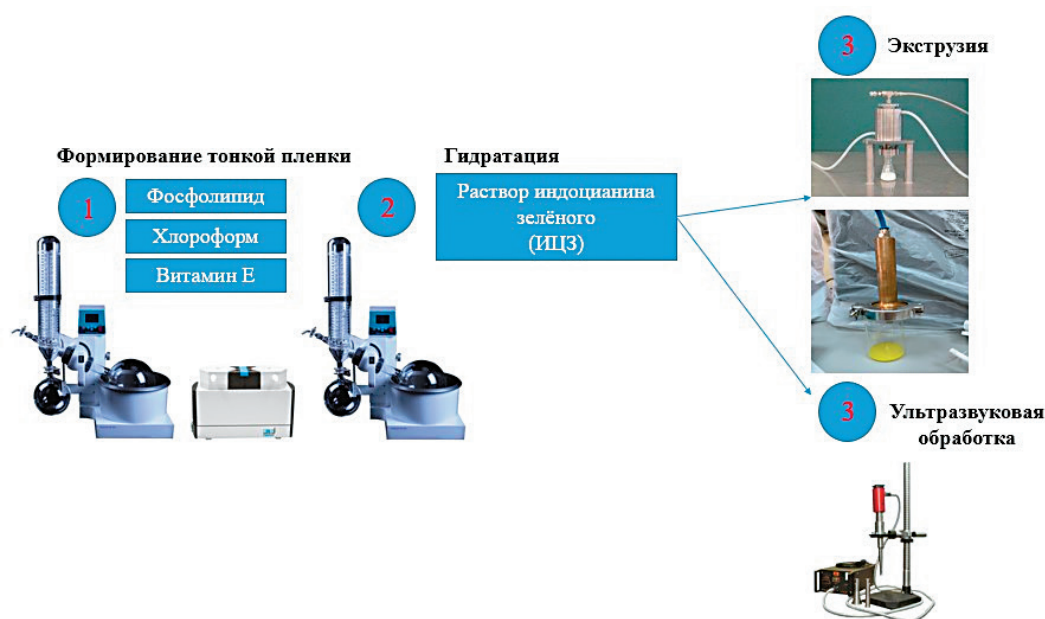


Рис. 1. Схема синтеза липосом

Figure 1. Scheme of liposome synthesis

различных органов и при моделировании различных процессов [15]. Гидратирующий раствор готовили следующим образом: в 30 мг ИЦЗ добавляли 30 мл воды и 0,264 мг хлорида натрия, а затем помещали на мешалку до полного растворения красителя.

Полученный коллоидный раствор липосом делили на три части по 10 мл и переливали в три полипропиленовых пробирки для дальнейшего исследования. Первый образец подвергался воздействию ультразвука с помощью диспергатора УЗГ13-0,1/22 на частоте 20 кГц на протяжении 15 мин. Вторая и третья части пропускались через разработанный экструдер и экструдер Liposofast LF-50 5 раз. В каждой серии было проведено по 3 опыта. Серии отличались мембранами, используемыми в экструдерах.

Для постобработки липосом экструзионным методом был разработан собственный аналог автоматического экструдера. За прототип был взят автоматический Liposofast LF-50 (Avestin, Канада). Основное отличие приборов заключалось в удобстве использования и размерах. Виды и размеры мембран для гомогенизации не отличались. Во время экструзии использовалось давление азота величиной до 20 атм, процесс повторялся 5–7 раз.

Для экструзии липосом использовались следующие типы мембран: поликарбонатные (ПК) 200 нм (Nuclepore, Whatman), полиэфирсульфонные (ПЭС) 200 нм (ФМПЭС-0,20, АО «Владисарт») и опытные образцы мембран на основе пористого анодного оксида алюминия (ПАОА).

Для соникации использовали ультразвуковой диспергатор УЗГ13-0,1/22 (НИИ ТВЧ, Россия). Метод заключался в погружении кончика диспергатора в готовую суспензию липосом и воздействию ультразвуком в течение 15 мин. При этом образец охлаждался на водяной бане до комнатной температуры.

Для определения различий в морфологии мембран их исследовали при помощи растрового электронного микроскопа Quanta Inspect (FEI, США) с двух сторон. Полученные изображения анализировали с помощью программы Image J для определения поверхностной пористости и распределения диаметра пор по размерам. Для получения распределения пор по размерам проводилось порядка 100 измерений. Однородность распределения пор оценивалась по ширине пика (FWHM) на полувысоте 49 % и 99 % соответственно.

После синтеза, ультразвуковой и экструзионной обработки проводили оценку основных физико-химических характеристик липосом. Гидродинамический диаметр наноматериалов и индекс полидисперсности в водных растворах определялся при помощи метода динамического рассеивания света (DLS) на приборе Zeta Sizer Ultra (Malvern Instruments, UK). Использовались следующие параметры прибора: время накопления кор-

реляционной функции составляло 120 с, распределение по размерам измерялось в трех повторностях, температура образца составляла 25 °С, использовался метод анализа General Purpose. Дополнительные настройки были выставлены по умолчанию. Обеспыливание коллоидного раствора не проводилось. За средний гидродинамический размер принималось значение Z-average, которое рассчитывалось по первичным данным Size Distribution Intensity.

Результаты и обсуждение

Выбор оксида алюминия для изготовления мембран продиктован следующими соображениями. Он является прозрачным, термостойким, биосовместимым, прочным, но не гибким материалом. Поверхность оксида алюминия содержит много ионов O_2^- , что делает этот материал гидрофильным (угол смачивания ~50–70°) [16].

Технология получения ПАОА заключается в электрохимическом анодировании алюминия в электролитах разного состава [17]. В момент протекания тока происходит окисление поверхности алюминия, начинает расти пленка оксида алюминия. В углублениях и дефектах пленки слой оксида растворяется быстрее вследствие высоких плотностей тока в этих местах, что приводит к разрастанию данных точек в поры, которые, дойдя до своего максимального размера, растут вглубь. Такая структура в итоге представляет собой пленку, поры которой закрыты с одной стороны слоем не прошедшего анодирования алюминия и барьерного слоя оксида алюминия. Для создания мембран, подходящих для гомогенизации липосом и ультрафильтрации, необходимо удалить барьерный слой оксида и самого алюминия химическими методами. Регулируя такие условия анодирования, как температура, напряжение, состав электролита и чистота исходного алюминия, можно управлять упорядоченностью и размером пор в получаемых пленках. Размер пор в ПАОА может варьироваться от десятков нм до единиц мкм. Мембраны на основе ПАОА намного прочнее своих конкурентов, при этом обладают очень высокой концентрацией пор (порядка 10^9 пор/см²).

Мембраны, рассматриваемые в этом исследовании, были получены совместно с УдмФИЦ УрО РАН. Синтез представлял собой механическую подготовку, которая включала прокатку и отжиг алюминия, электрохимическое анодирование алюминия в 0.3М растворе щавелевой кислоты ($0.3M(COOH)_2$), удаление алюминия на обратной стороне образца с помощью хлорида меди, удаление барьерного слоя оксида алюминия на обратной стороне и растравливание пор в 5 % растворе фосфорной кислоты до момента, пока диаметр пор не составит 200 нм [18].

По данным электронной микроскопии, мембраны ПАОА имели высокоразвитую поверхность с круглыми сквозными порами высокой плотности (рис. 2).

Для анализа мембран ПАОА в поперечном сечении была проведена съемка скола. Полученная мембрана имела толщину 213 мкм, все поры имели

однородную, прямую, сквозную структуру на протяжении всей толщины. На изображении отчетливо видно резкое изменение мембран со стороны выхода липосомального раствора, визуализируются две ступени толщиной 17 и 20 мкм (рис. 3). При более детальном рассмотрении видно, что эта часть

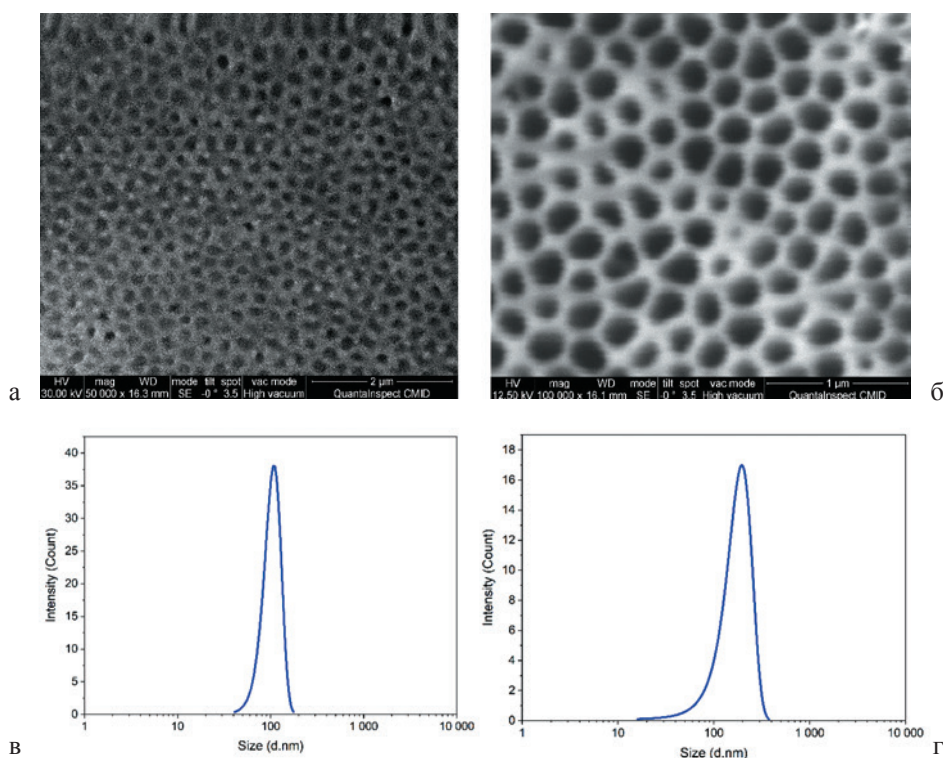


Рис. 2. РЭМ изображение поверхности мембраны ПАОА

(а, б) и распределение пор по размерам на поверхности (в, г):

а, в — со стороны входа липосомального раствора; б, г — со стороны выхода липосомального раствора

Figure 2. SEM image of the PAAO membrane

(a, b) and pore size distribution on the surface (c, d):

a, c — from the liposomal solution inlet side; b, d — from the liposomal solution outlet side

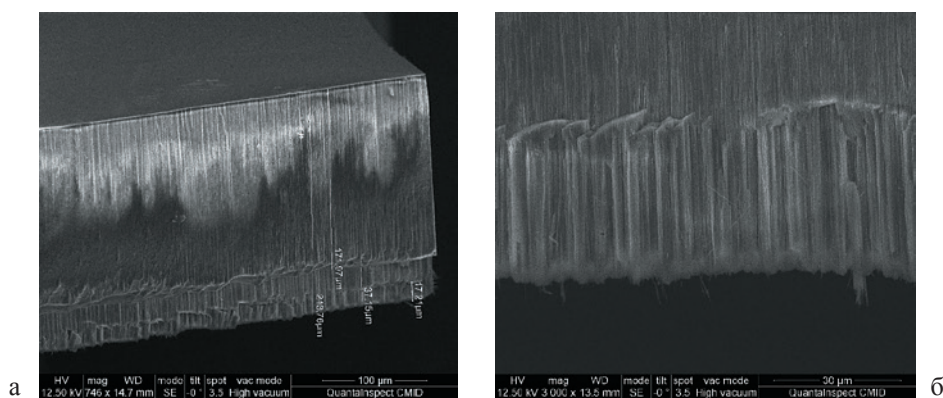


Рис. 3. РЭМ изображение скола мембраны ПАОА:

а — со стороны входа липосомального раствора; б — со стороны выхода липосомального раствора

Figure 3. SEM image of a cleavage of a PAAO membrane:

a — from the liposomal solution inlet side; b — from the liposomal solution outlet side

подверглась серьезному разрушению: произошел менее равномерный скол образца, многие поры отделились от цельной мембраны и вывалились наружу в виде волосков, откололись целые агломераты пористого оксида. Также со стороны входа липосомального раствора видно объединение некоторых пор в одну. Особенности полученной структуры вызваны одним из технологических процессов при создании мембраны — химическим растравливанием пор для более точного достижения необходимого размера. Сторона, из которой выходит липосомальный раствор, являлась контактной площадкой для получения мембраны в процессе электрохимического анодирования и имела сразу открытые поры. В то же время другая сторона изначально имела закрытые поры из-за наличия толстого барьерного слоя оксида алюминия, который впоследствии частично удалялся для открывания пор. Дополнительное растравливание по-разному повлияло на стороны образца: с одной стороны, при растравливании происходило растворение остатков барьерного слоя, а с другой — раствор все время действовал на поры, что привело к частичному разрушению мембраны [18]. Несмотря на это, полученные мембраны могут использоваться в гомогенизации и успешно выполнять свою функцию.

Для получения более совершенных и долговечных мембран необходимо более точно подбирать параметры электрохимического анодирования.

Распределение по размерам показало средний размер пор со стороны входа липосомального раствора около 108 нм, а со стороны выхода — 195 нм, с высокой однородностью (индекс полидисперсности составил $0,09 \pm 0,01$).

Так как поликарбонат является диэлектриком, рассмотрение его с помощью РЭМ дает смазанную картину из-за накопления заряда на мембране (рис. 4).

На поверхности видны круглые поры, оставленные после ионной бомбардировки. Такая методика синтеза позволила получить очень однородные поры, но с низкими показателями пористости. Также можно заметить, что количество пор с разных сторон мембраны неодинаково, что говорит о наличии тупиковых треков.

Полученные графики распределения пор по размерам (рис. 5) говорят о очень высокой однородности FWHM — 33 нм для входа и 10 нм — для выхода. Средний размер пор составил 139 нм и 119 нм соответственно.

Изображения, полученные для ПЭС мембран, демонстрируют различие методик синтеза по отношению к другим мембранам (рис. 5).

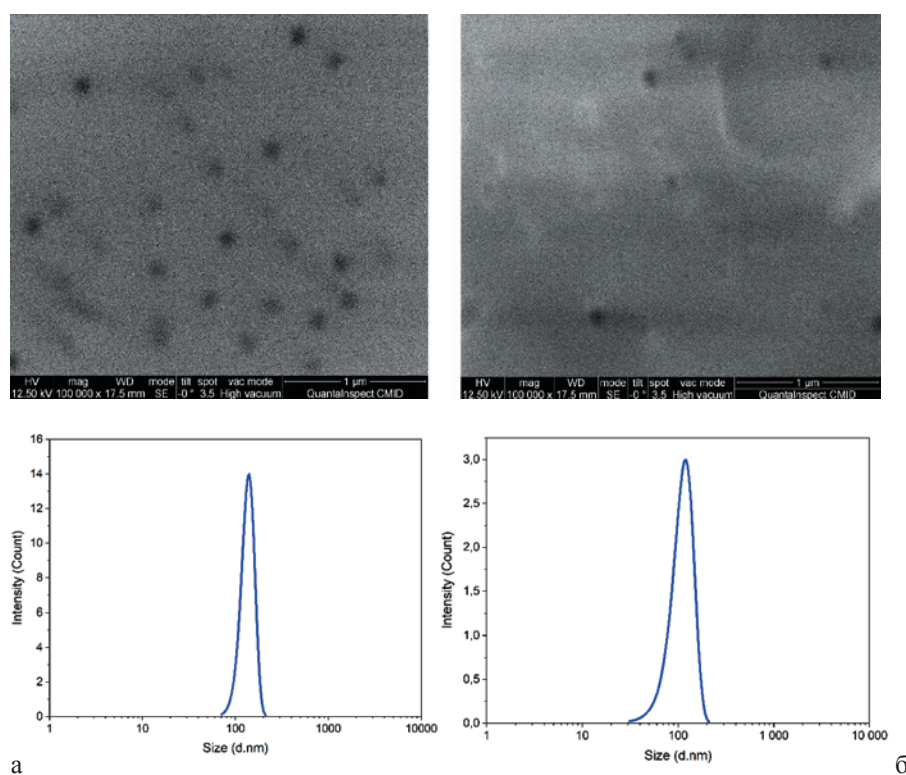


Рис. 4. РЭМ изображение поверхности мембраны ПК:

а — со стороны входа липосомального раствора; б — со стороны выхода липосомального раствора

Figure 4. SEM image of the PC membrane surface:

a — from the liposomal solution inlet side; b — from the liposomal solution outlet side

Поры в данном фильтре образуют между собой сложную систему каналов, размер которых зависит от концентрации порообразующего нерастворителя, используемого в процессе синтеза. Мембрана обладает высокой пористостью, но хаотичной формой пор и наличием структурных дефектов на ее поверхности.

Анализ поверхности мембраны показал высокий разброс по размеру пор (FWHM — 360 нм для входа и 185 нм — для выхода) и средний размер 401 нм и 479 нм соответственно.

Наиболее однородными являются мембраны на основе ПК, а наименее однородными — на основе ПЭС. Все мембраны имеют заявленный диаметр пор 200 нм, однако только для ПАОА этот параметр близок к реальному значению. Наибольшей пористостью обладают мембраны ПАОА, наименьшей — поликарбонатные. Все эти параметры могут влиять на конечный результат экстракции.

В ходе эксперимента было замечено, что для прохождения раствора через мембраны необходимо разное давление: для ПЭС мембраны достаточно 1,5–2 атм, для ПК — 5 атм, ПАОА — 4–6 атм, что существенно влияет на скорость экстракции.

Отличие мембран по давлению, необходимому для экстракции, можно объяснить формулой Пуазейля,

которая связывает скорость протекания жидкости через тонкую цилиндрическую трубу под давлением:

$$v = \frac{\pi * r^4 * P}{8 * \eta * l}, \quad (1)$$

где v — объемная скорость течения сквозь одну пору, r — радиус поры, P — перепад давления, η — коэффициент динамической вязкости, l — толщина мембраны.

Добавим концентрацию пор k на единицу площади, чтобы получить скорость потока жидкости V , проходящего через всю мембрану, тогда

$$V = \frac{\pi * r^4 * P * k}{8 * \eta * l}. \quad (2)$$

Такое сравнение больше подойдет для мембран со сквозными порами, как у ПАОА и ПК, но данные зависимости должны сохраняться и для ПЭС. При одинаковой скорости потока раствора на выходе из мембраны высокое давление гомогенизации для ПК связано с очень низким значением пористости k .

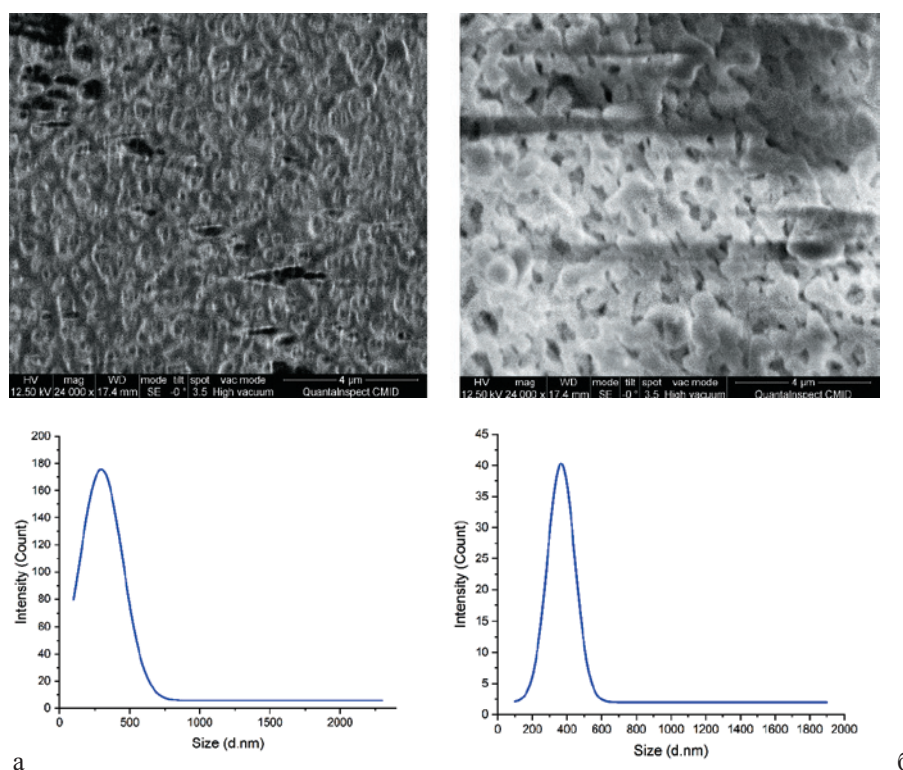


Рис. 5. РЭМ изображение поверхности мембраны ПЭС:

а — со стороны входа липосомального раствора; б — со стороны выхода липосомального раствора

Figure 5. SEM image of the PES membrane surface:

а — from the liposomal solution inlet side; б — from the liposomal solution outlet side.

Несмотря на высокую пористость мембраны ПАОА, она тоже требует высокого давления, но в данном случае это связано с толщиной фильтра. ПЭС и ПК мембраны обладают толщиной в десятки мкм, тогда как ПАОА имеет толщину в 200 мкм, поэтому нужно большее давление, чтобы продавить мембрану сквозь нее. Толщину мембраны ПАОА можно уменьшить в процессе синтеза, регулируя время анодирования, но тогда пострадают прочностные характеристики фильтра. Низкое давление гомогенизации для ПЭС связано с тонкостью самой мембраны, высоким размером пор и наличием пересечений между каналами. Последний фактор не учитывается в формуле, но может оказывать существенное влияние.

До постобработки средний размер липосом составлял $12,0 \pm 1,3$ мкм с индексом полидисперсности (PDI) $0,48 \pm 0,10$ (рис. 6). Такой раствор не подходит для практического использования и требует обязательной дополнительной обработки.

После 15-минутной ультразвуковой обработки удалось уменьшить средний гидродинамический размер липосом до $342,10 \pm 3,19$ нм при индексе полидисперсности $0,391 \pm 0,03$. Однако стоит отметить, что распределение по размерам все еще достаточно широкое, что говорит о не самой высокой гомогенности раствора. Можно наблюдать небольшую фракцию липосом со средним размером больше 1 мкм. Кроме того, процентное содержание липосом требуемого размера не самое высокое.

После пятикратной обработки с помощью экстрадера Liposofast LF-50 через поликарбонатную мембрану под давлением в 5 атм можно наблюдать,

что средний гидродинамический размер липосом уменьшился до $326,8 \pm 1,5$ нм, что несколько ниже среднего размера пор в мембране. При этом индекс полидисперсности составил $0,08 \pm 0,01$, что говорит о высокой гомогенности липосом в растворе.

Экструдер собственного производства показал во многом схожие результаты, средний гидродинамический размер липосом, как и индекс полидисперсности, значительно уменьшились и составили $156,5 \pm 2,08$ нм и $0,14 \pm 0,02$ соответственно. Меньший размер липосом по сравнению с обработкой экстрадером Liposofast LF-50 можно объяснить тем, что, несмотря на одинаковый заявленный средний размер пор у мембран, фактический размер пор может заметно отличаться, что было показано выше.

Было проведено сравнение постэкструзионной обработки, выполненной с помощью ПАОА мембраны. Результаты представлены на рисунке 8.

В результате экструзии исходного образца с помощью экстрадера Liposofast удалось получить больший размер липосом $216,4 \pm 3,5$ нм. Кроме того, значение ИПД раствора оказалось равным $0,21 \pm 0,01$.

Экструдер собственного производства показал результаты, аналогичные канадскому. Средний гидродинамический размер составил $147,2 \pm 2,6$ нм, а индекс полидисперсности — $0,23 \pm 0,07$. Стоит отметить присутствие небольшой фракции липосом с размером около 50 нм.

Также следует упомянуть важную особенность: для экструзии липосом через ПАОА мембрану потребовалось несколько другое давление — от 4 до 6 атм.

На рисунке 9 представлены результаты экструзии образцов липосом через ПЭС мембраны.

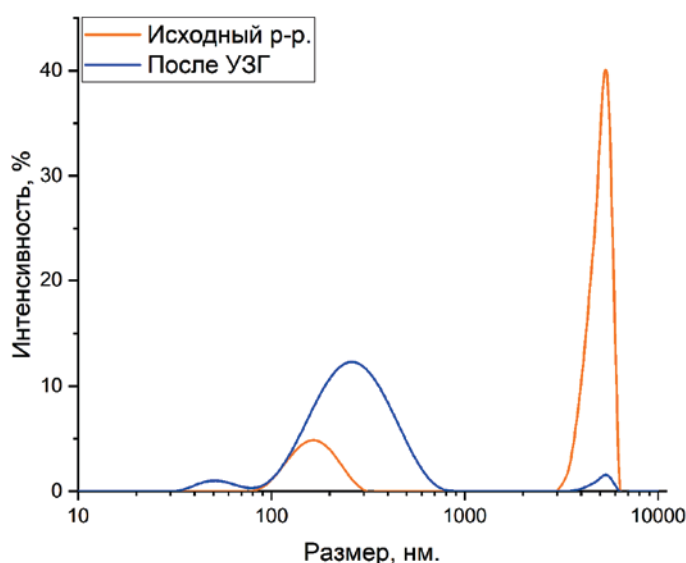


Рис. 6. Распределение липосом по размеру до и после ультразвуковой обработки

Figure 6. Liposome size distribution before and after ultrasonic treatment

Экструзионная обработка с помощью экструдера Liposofast показала лучшие результаты: средний гидродинамический размер липосом составляет $237,2 \pm 3,0$ нм. Однако индекс полидисперсности оказался заметно ниже: $0,079 \pm 0,047$. Кроме того, значение интенсивности заметно выше, что может означать более высокий процент липосом в итоговом растворе.

В случае обработки с помощью экструдера собственного производства получились липосомы

с большим гидродинамическим размером, чем при экструзии с Liposofast. Их размер составил $301,3 \pm 8,2$ нм.

Однако индекс полидисперсности оказался ниже, чем после УЗГ, но выше, чем после Liposofast — $0,164 \pm 0,029$. Интенсивность также оказалась выше, чем после ультразвуковой обработки. Таким образом, такие липосомы пригодны для дальнейшего медицинского использования.

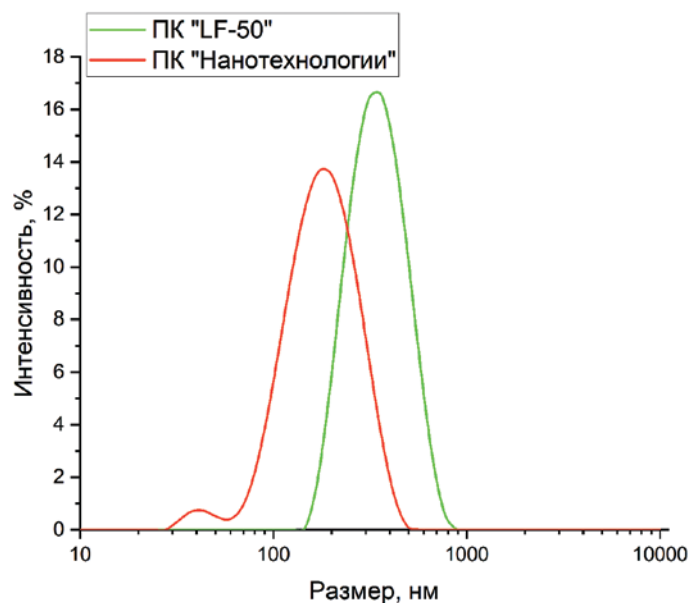


Рис. 7. Сравнение размеров липосом после экструзионной обработки с помощью ПК мембраны

Figure 7. Comparison of liposome sizes after extrusion processing using PC membrane

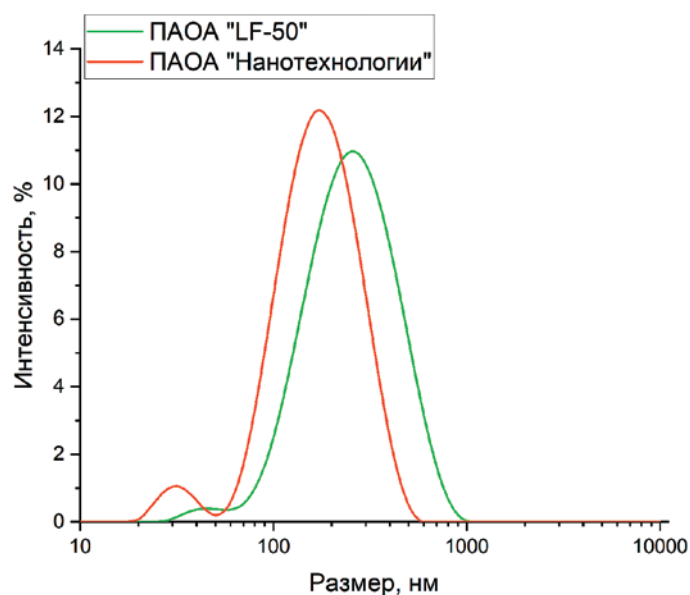


Рис. 8. Сравнение размеров липосом после экструзионной обработки с помощью ПАОА мембраны

Figure 8. Comparison of liposome sizes after extrusion processing using PAOA membrane

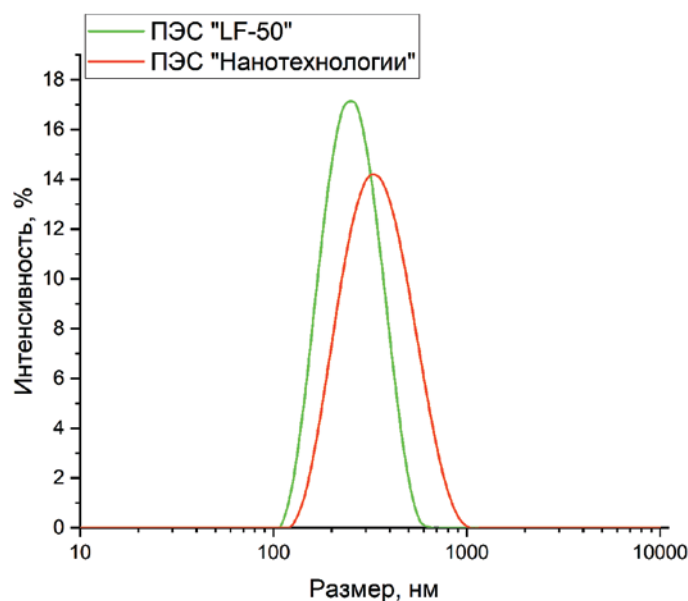


Рис. 9. Сравнение размеров липосом после экструзионной обработки с помощью ПЭС мембраны

Figure 9. Comparison of liposome sizes after extrusion processing using PES membrane

Важным замечанием является то, что экструзионная обработка липосом с ПЭС мембранами проходит при гораздо более низком давлении: от 1 до 2 атм, что значительно влияет на скорость экструзии.

Для наглядности результаты всех обработок сведены в одну таблицу.

Сравнение соникации и экструзии показало способность обоих методов уменьшать даже большие мультислойные везикулы. В большинстве случаев экструзия дает более гомогенный раствор липосом меньшего размера, при этом размер полученных липосом более точно контролируется используемой мембраной. Также в пользу метода экструзии говорит меньший шанс разрушить липосомы в процессе обработки и дополнительная фильтрация и стерилизация конечного продукта. Скорость процесса в случае экструзии может отличаться в зависимости от прикладываемого давления. В целом, ультразвуковая обработка несколько менее затратна по времени. В конечном счете, при выборе методики обработки липосом стоит отдавать предпочтение именно экструзии, так как средний гидродинамический размер получается, как правило, меньшим, чем при ультразвуке, а гомогенность раствора несравнимо выше. Но, так как экструзия требует специального оборудования, метод соникации более доступен.

При сравнении данных, полученных с использованием разных экструдеров, выявлено, что разработанный прибор не уступает в эффективности, при этом обладает более простой и удобной для пользователя конструкцией.

Наилучший результат в отношении гомогенности раствора дает поликарбонатная мембрана. Липосомы, гомогенизированные с помощью ПЭС мембраны, дают худший результат из представленных фильтров. Основываясь на данных, полученных с помощью РЭМ, можно прийти к выводу, что это связано с большим разбросом размера пор и большим значением пор для ПЭС. Несмотря на размер пор около 400 нм, конечный размер везикул оказался меньше, что может говорить о более тонких каналах внутри фильтра. При этом сетчатая система пор ПЭС проигрывает сквозным порам как в ПК и ПАОА, поскольку такой фильтр может быстро засориться. ПАОА показал средние характеристики среди представленных фильтров, но стоит заметить: данный результат сохраняется при использовании одной мембраны в нескольких гомогенизациях. Для многократного использования достаточно однократной промывки в этаноле и полярном растворителе, например, хлороформе, это удалит липиды и инкапсулированное вещество с поверхности фильтра. В конечном счете все мембраны подходят для гомогенизации и показали удовлетворительный результат.

Выводы

В ходе исследования проведено сравнение двух методов постобработки липосом — ультразвукового и экструзионного, а также оценена эффективность двух экструдеров (Liposofast LF-50 и собственной разработки) и трех типов мембран (поликарбонат, полиэфирсульфон и лабораторный образец пористого

Таблица. Результаты гомогенизации липосом**Table.** Liposome homogenization results

	Гидродинамический размер до обработки, мкм	PDI	Гидродинамический размер после обработки, нм	PDI	Давление, атм
Соникация	12,0±1,3	0,48±0,10	342,10±3,19	0,391±0,03	-
LF-50 ПК			326,8±1,5	0,08±0,01	5
Экструдер «Нанотехнологии» ПК			156,5±2,08	0,14±0,02	5
LF-50 ПЭС			237,2±3,0	0,079±0,047	1–2
Экструдер «Нанотехнологии» ПЭС			301,3±8,2	0,164±0,029	1–2
LF-50 ПАОА			216,4±3,5	0,21±0,01	4–6
Экструдер «Нанотехнологии» ПАОА			147,2±2,6	0,23±0,07	4–6

анодного оксида алюминия). Полученные результаты демонстрируют преимущество экструзионного метода, обеспечивающего липосомы с меньшим средним размером 250 нм и низким индексом полидисперсности PDI 0,15, по сравнению с ультразвуковой обработкой (PDI до 0,4). Разработанный экструдер не уступает коммерческому аналогу, а мембраны из поликарбоната и ПАОА превосходят полиэфирсульфон по гомогенизации. Таким образом, экструзия рекомендуется как оптимальный метод для получения однородных липосомальных препаратов с потенциалом промышленного применения, особенно с использованием отечественных мембран ПАОА и конструкций экструдеров.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России «Разработка метода адресной доставки на основе наноконъюгатов кардио-таргетных пептидов» (рег. №: 124021600063-1). / The work was carried out within the framework of the state assignment of the “Development of a targeted delivery method based on nanoconjugates of cardio-targeted peptides” (Registration No.: 124021600063-1).

Соответствие нормам этики / Compliance with ethical principles

Авторы заявляют об отсутствии использования генеративного искусственного интеллекта. / The authors declare no use of Generative AI in the preparation of this manuscript.

Список литературы / References

- Li Z, Peng S, Chen X, et al. Effect of dynamic high pressure microfluidization on structure and stability of Pluronic F127 modified liposomes. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 2019;40(7):982–989. <https://doi.org/10.1080/01932691.2018.1489281>
- Schroeder A, Kost J, Barenholz Y. Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control release of drugs from liposomes. *Chemistry and physics of lipids*. 2009;162(1–2):1–16. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2009.08.003>
- Burnard D, Monnier CA, Rothen-Rutinshausen B, et al. Magnetoliposomes: opportunities and challenges. *European journal of nanomedicine*. 2014;6(4):201–215. <https://doi.org/10.1515/ejnm-2014-0042>
- Shah VM, Nguyen DX, Patel P, et al. Liposomes produced by microfluidics and extrusion: a comparison for scale-up purposes. *Nanomedicine*. 2019;18:146–156. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.02.019>
- Mui BL, Cullis PR, Evans EA, et al. Osmotic properties of large unilamellar vesicles prepared by extrusion. *Bio-phys. J.* 1993;64(2):443–453. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81385-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81385-7)

6. Cho NJ, Hwang LY, Solandt JJR, et al. Comparison of extruded and sonicated vesicles for planar bilayer self-assembly. *Materials*. 2013;6(8):3294–3308. <https://doi.org/10.3390/ma6083294>
7. Singh B, Mundlamuri R, Friese T, Mundrigi A, Handt S, Loewe T. Benchmarking of sterilizing-grade filter membranes with liposome filtration. *PDA J Pharm Sci Technol*. 2018;72(3):223–235. <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2017.007757>
8. Ong SG, Chitneni M, Lee KS, et al. Evaluation of Extrusion Technique for Nanosizing Liposomes. *Pharmaceutics*. 2016;8(4):36. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8040036>
9. Zourna K, Iwaniec A, Turner S, et al. Optimizing the filtration of liposomes using sterilizing-grade filters. *PDA J Pharm Sci Technol*. 2021;75(2):128–140. <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2020.011866>
10. Ануфриев И. Е., Муратова Е. Н., Королев Д. В. и др. Разработка ручного экструдера для гомогенизации липосом. *Физико-химические аспекты изучения кластеров, наноструктур и наноматериалов*. 2022;14:8–16. <https://doi.org/10.26456/pcascnn/2022.14.008>; <https://elibrary.ru/ORWNGY>
- Ануфриев ИЕ, Муратова ЕН, Королев ДВ, et al. Development of a manual extruder for liposome homogenization. *Physical and chemical aspects of the study of clusters, nanostructures and nanomaterials*. 2022;14:8–16. (In Russ.) <https://doi.org/10.26456/pcascnn/2022.14.008>; <https://elibrary.ru/ORWNGY>
11. Peyret A, Ibarboure E, Pippa N, Lecommandoux S. Liposomes in polymersomes: multicompartiment system with temperature-triggered release. *Langmuir*. 2017;33:7079–7085. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00655>
12. Zhu TF, Budin I, Szostak JW. Vesicle extrusion through polycarbonate track-etched membranes using a hand-held mini-extruder. *Methods Enzymol*. 2013;533:275–282. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420067-8.00021-0>
13. Дмитриева М. В., Лугэнъ Б., Оборотова Н. А. и др. Метод экструзии в технологии получения липосом. *Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация*. 2020;3:87–96. <https://elibrary.ru/XUUGKU>
- Дмитриева МВ, Lugen B, Oborotova NA, et al. Extrusion method in the technology preparation of liposomes. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2020;3:87–96. (In Russ.) <https://elibrary.ru/XUUGKU>
14. Никифоров А. И., Шулмейстер Г. А., Истомина М. С. и др. Получение липосом с инкапсулированным кардиопротектором, исследование физико-химических свойств, кинетики высвобождения и биораспределения in vivo. *Трансляционная медицина*. 2025;12(3):256–267. <https://doi.org/10.18705/2311-4495-2025-12-3-256-267>; <https://elibrary.ru/OSPQRW>
- Никифоров АИ, Shulmeyster GA, Istomina MS, et al. Preparation of liposomes with an encapsulated cardioprotector, study of physicochemical properties, release kinetics and biodistribution in vivo. *Translational Medicine*. 2025;12(3):256–267. (In Russ.) <https://doi.org/10.18705/2311-4495-2025-12-3-256-267>; <https://elibrary.ru/OSPQRW>
15. Korolev DV, Shulmeyster GA, Istomina MS, et al. Indocyanine green-containing magnetic liposomes for constant magnetic field-guided targeted delivery and theranostics. *Magnetochemistry*. 2022;8:127. <https://doi.org/10.3390/magnetochemistry8100127>
16. Грибанова Е. В., Ларионов М. И., Васютин О. А., Кучек А. Э. Зависимость угла смачивания на оксидной пленке алюминия от pH раствора. *Вестник СПбГУ: Физика и химия*. 2012;4(1):76–81. <https://elibrary.ru/OQSLEV>
- Gribanova EV, Larionov MI, Vasyutin OA, Kuchek AE. Dependence of contact angle on pH of solution for oxide film on the surface of. *Bulletin of St. Petersburg University. Physics. Chemistry*. 2012;4(1):76–81. (In Russ.) <https://elibrary.ru/OQSLEV>
17. Wang N, Zhang W, Xu J, et al. Initial stage of pore formation process in anodic aluminium oxide template. *Journal of Solid State Electrochemistry*. 2010;14(8):1377–1382. <https://doi.org/10.1007/s10008-009-0959-2>
18. Anufriev IE, Muratova EN, Valeev RG, et al. Nanoporous membranes based on aluminum oxide for homogenization of a liposomal solution. *Vestnik NovSU*. 2023;1(130):9–21. [https://doi.org/10.34680/2076-8052.2023.1\(130\).9-21](https://doi.org/10.34680/2076-8052.2023.1(130).9-21)

Информация об авторах:

Никифоров Алексей Игоревич — младший научный сотрудник НИЛ нанотехнологий, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия, ainikiforov@stud.etu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4639-539X>;

Ануфриев Илья Евгеньевич — младший научный сотрудник НИЛ нанотехнологий, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; студент СПбГЭТУ «ЛЭТИ», Санкт-Петербург, Россия, ilya_anufriev_00@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9389-5672>;

Валеев Рашат Галеевич — кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории атомной структуры и анализа поверхности, Удмуртский федеральный исследовательский центр УрО АН РФ, Ижевск, Россия, rishatvaleev@udman.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8981-8527>;

Трушлякова Валентина Владимировна — кандидат технических наук, доцент кафедры микро- и нанoeлектроники, научный сотрудник Центра микротехнологии и диагностики в Санкт-Петербургском государственном электротехническом университете «ЛЭТИ», Санкт-Петербург, Россия, vvtrushliakova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5812-1890>;

Королев Дмитрий Владимирович — доктор химических наук, доцент, заведующий НИЛ нанотехнологий, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; научный сотрудник ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия, dimon@cardioprotect.spb.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2848-3035>.

Вклад авторов:

Никифоров А. И. — проведение эксперимента, описание методики эксперимента; Ануфриев И. Е. — разработка экструдера, мембраны, проведение эксперимента, описание методики эксперимента, написание статьи; Валеев Р. Г. — разработка мембраны; Трушлякова В. В. — микроскопический анализ; Королев Д. В. — общее руководство, написание статьи.

Authors information:

Aleksey I. Nikiforov, Junior Research Fellow, Nanotechnology Research Laboratory, V.A. Almazov NMRC, St. Petersburg, Russia, ainikiforov@stud.etu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4639-539X>;

Ilya E. Anufriev, Junior Research Fellow, Nanotechnology Research Laboratory, V.A. Almazov NMRC; Student, Saint Petersburg Electrotechnical University “LETI”, St. Petersburg, Russia, ilya_anufriev_00@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9389-5672>;

Rishat G. Valeev, Research Fellow, Laboratory of Atomic Structure and Surface Analysis, Udmurt Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russia, rishatvaleev@udman.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8981-8527>;

Valentina V. Trushlyakova, Candidate of Technical Sciences, Associate Professor, Department of Micro- and Nanoelectronics, Research Fellow, Center for Collective Use “Center for Microsystems Technology and Electronic Component Base”, Saint Petersburg Electrotechnical University “LETI”, St. Petersburg, Russia, vvtrushliakova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5812-1890>;

Dmitry V. Korolev, Doctor of Chemical Sciences, Associate Professor, Head of the Nanotechnology Research Laboratory, V.A. Almazov NMRC, Research Fellow, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia, dimon@cardioprotect.spb.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2848-3035>.

Contribution of the authors:

Nikiforov A. I. — conducting the experiment, describing the experimental methodology; Anufriev I. E. — development of the extruder and membrane, conducting the experiment, describing the experimental methodology, writing the article; Valeev R. G. — membrane development; Trushlyakova V. V. — microscopic analysis; Korolev D. V. — general supervision, writing the article.

Поступила в редакцию / Received: 11.11.2025

Принята к публикации / Accepted: 16.01.2026
