

© Коллектив авторов, 2014

И. М. Бушмакина, М. А. Мартынова, Е. В. Князева

XXI ВЕК: КАК ИЗМЕНИЛИСЬ НАШИ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ

ГНУ "Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси", Минск, Беларусь

В обзоре представлена современная информация о разработке наноразмерных переносчиков лекарственных средств на примере липосом. Кратко изложены хронологические аспекты изучения липосом, включая их строение, состав, взаимодействие с молекулами и использование в качестве резервуарных систем доставки лекарств. Рассмотрены медицинские преимущества липосомальных препаратов по сравнению с применением традиционных лекарственных средств. Обсуждаются приёмы повышения эффективности включения лекарственного соединения в липосомы и стабилизации липосомальных лекарств, а также механизмы их взаимодействия с клетками.

Ключевые слова: липосомы; пероксидное окисление липидов; холестерин; антиоксиданты.

Нано- и микроразмерные носители лекарственных препаратов — перспективная и быстро развивающаяся область знания на стыке науки и технологии [1 – 4]. Липосомы полностью биodeградируемы и их составляющие могут быть утилизированы в качестве компонентов клеточных мембран, уменьшают острую токсичность инкорпорированных лекарственных соединений и в то же время защищают их от инактивирующего влияния ингибиторов и ферментов крови. Более того, липосомы дают уникальную возможность доставки лекарственных веществ внутрь клеток, с которыми они взаимодействуют по механизмам слияния и эндоцитоза.

Однако поскольку липосомальная терапия существенно дороже традиционной, ее использование следует считать оправданным только после получения четких доказательств медицинских преимуществ по сравнению с применением традиционных лекарственных средств. Такими преимуществами могут быть:

Биосовместимость — вследствие сродства липосомальных везикул к природным мембранам клеток по химическому составу. Известно, что липиды, входящие в состав биологических мембран, составляют от 20 до 80 % их массы. Поэтому при правильном подборе компонентов липосом их введение в организм не вызывает негативных реакций. Кроме того, липосомы сравнительно легко разрушаются в организме, высвобождая доставленные вещества [5 – 7].

Биодоступность активного вещества — создание сложных искусственных адьювантных систем с целью преодоления проблем, связанных с низкой фармакокинетической эффективностью различных лекарственных средств. Применение липосом, как средств доставки, позволяет в некоторых случаях существенно увеличить биодоступность, в других случаях — на-

против, позволяет предотвратить чрезмерное увеличение концентрации препарата в крови, тем самым снижая опасность передозировки и уменьшая побочные эффекты [8, 9].

Универсальность — вследствие полусинтетической природы липосом можно варьировать их размеры, физические характеристики, состав поверхности, благодаря чему в липосомальные везикулы можно инкорпорировать широкий набор фармакологически активных веществ. Кроме того, липосомальным средствам доставки лекарственных веществ можно придать в процессе их конструирования специфические свойства. Примером являются так называемые липосомы "активного нацеливания", получаемые путем "пришивания" к фосфолипидной мембране высокоаффинных лигандов, которые обладают способностью связываться только с рецепторами клеток-мишеней [10, 11]; либо липосомы могут быть чувствительны к температуре или pH. При нормальных (физиологических) условиях термо- и pH-чувствительные липосомы имеют достаточно жесткую мембрану, однако при понижении pH-среды до 6,9 и ниже, что свойственно опухолевым тканям, либо условия создаются искусственно — при использовании гипертермии до 40 °C для терапии злокачественного образования, проницаемость мембраны липосом резко увеличивается [12, 13]. Вопросы конструирования таких наночастиц представляют отдельную научную задачу. В то же время при формировании липосом "пассивного нацеливания" можно создать везикулы, размер которых больше диаметра пор капилляров, а, следовательно, зона их распределения будет ограничена компартментом введения. Например, при внутривенном введении они не смогут выйти за пределы кровотока, а, значит, плохо проникнут в органы и ткани. На этом свойстве, в частности, базируется

принцип направленной доставки лекарственного вещества в опухоли и очаги воспаления, так как капилляры, снабжающие эти области кровью, сильно перфорированы, следовательно, липосомы будут накапливаться в опухоли [14].

Пролонгированность действия липосомальных форм лекарственных средств из-за изменения их фармакокинетических свойств. Так, многие лекарственные препараты имеют низкий терапевтический индекс из-за того, что концентрации, в которых они оказывают лечебное действие, мало отличаются от концентрации, при которой препарат становится токсичным [15, 16]. В других случаях лекарственный препарат при введении в организм может быстро терять активность под действием инактивирующих агентов. Включение таких лекарственных соединений в липосомы может значительно повысить их терапевтическую эффективность, поскольку, с одной стороны, препарат, находящийся в липосоме, защищен ее мембраной от действия неблагоприятных факторов, а с другой — та же мембрана не позволяет токсическому препарату превысить допустимую концентрацию в биологических жидкостях организма. Липосома в данном случае выполняет роль “хранилища”, из которого лекарственное вещество высвобождается постепенно, в нужных дозах и в течение требуемого промежутка времени, отсюда следует и снижение эффективной терапевтической дозы препарата при лечении заболевания [15 – 17].

Локальное, а не системное действие за счет преимущественного накопления липосом в очаге поражения (эти свойства придаются липосомальным формам лекарственных соединений в процессе конструирования), что снижает токсичность лекарственного вещества (в разы) и повышает терапевтическую эффективность [10, 18].

Однако ситуация с терапевтическим применением липосомальных лекарственных средств не так проста, как хотелось бы. Оказалось, что липосомы недостаточно стабильны в крови и быстро выводятся из кровотока макрофагами, которые находятся в печени, селезенке и костном мозге [16, 19]. По этой же причине липосомные носители зачастую не удается направить именно в те органы и ткани, где происходит патологический процесс. Тем не менее привлекательность липосом настолько велика, что разработаны различные приемы, позволяющие решать эти проблемы. Так, было предложено модифицировать поверхность липосом путем присоединения полимерных молекул с длинной гидрофильной цепью, например полиэтиленгликолем (ПЭГ), поли[-(2-гидроксипропил)метакриламид]ом, поливиниловым спиртом, дистеарилфосфатидилэтанолламин-поли(этиленгликолем)2000 [14 – 16]. Антитела и другие защитные белки не могут достичь поверхности такой стерически модифицированной липосомы из-за избыточного осмотического давления в примембранной зоне, создаваемого гибкими цепями иммобилизованных полимеров, в результате чего макрофаги не воспринимают их как подлежащие удалению чуже-

родные частицы. Так как эти везикулы являются невидимыми для клеток ретикуло-эндотелиальной системы (отсюда и название “stealth liposomes”) [14, 16, 20 – 22], они долгое время (более 2 сут) циркулируют в кровотоке. Такие ПЭГ-содержащие липосомы постепенно накапливаются в тех местах, где кровеносные сосуды были повреждены, обладали повышенной проницаемостью или вообще плохо развиты, что обычно характерно для опухолей, а также при инфекционных и воспалительных процессах. Кроме того, проблема доставки лекарственного вещества в нужное место может быть решена путем локального применения липосомальных препаратов [23], либо посредством прикрепления к поверхности липосом молекул, специфичных к клеткам-мишеням [21, 24, 25].

Особенно целесообразным, по мнению многих исследователей, является использование липосом при заболеваниях инфекционной природы [10, 23, 26, 27], поскольку и патогенные микроорганизмы, и липосомы, несущие антибиотики, захватываются преимущественно системой фагоцитирующих мононуклеаров, макрофагальными элементами крови и тканей, где и может непосредственно реализоваться действие лекарственного средства на возбудителя.

Вместе с тем терапия с помощью липосомальных препаратов является более дорогостоящей по сравнению с традиционным лечением из-за дополнительных затрат на инкапсулирование активного вещества в липидный “контейнер” и его возможных потерь в процессе формирования липосом.

Липосомы: строение и состав

В 1964 г. в Англии А. Д. Бэнгхем с коллегами наблюдали образование субмикроскопических круглых частиц (липосом) при добавлении воды к амфипатическим веществам — фосфолипидам (ФЛ) [16]. Их структура — водная сердцевина, окруженная липидным бислоем, в котором молекулы фосфолипидов неполярными частями обращены друг к другу, а полярными — в водную фазу. При формировании липосом водная сердцевина позволяет включать воду и присутствующие в ней растворенные вещества, а липидный бислой — гидрофобные соединения. То есть практически любое вещество можно инкорпорировать в липосомы, независимо от его растворимости, размеров и электрического заряда. Схематически структура липосом представлена на рисунке 1 [5].

Липосомы чаще состоят из липидов природного происхождения, например, фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтанолламина, фосфатидилсерина, фосфатидилглицерина, фосфатидилинозита и др. [5, 10, 19, 28, 29]. Однако и другие нативные или синтетические соединения, обладающие амфифильным характером (такие как церамиды, жирные кислоты, лизолипиды), а также неионогенные и ионогенные поверхностно-активные вещества в определенных условиях могут образовывать везикулы [28, 30]. Кроме того, как правило, липосомы содержат холестерин (ХС), компоненты, обладающие электрическим зарядом, зачастую антиоксиданты, буферы и электролиты. Показано, что

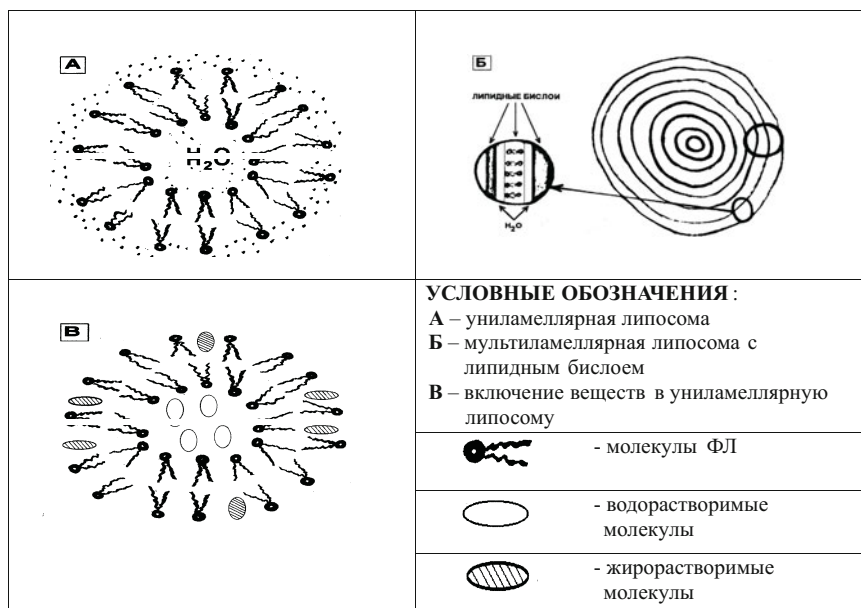


Рис. 1. Схематическое изображение липосомы [5].

если везикулы получены только из ФЛ, то в сыворотке или плазме крови их барьеры проницаемости быстро повреждаются (эффект подтекания липосом) вследствие взаимодействия с липопротеинами высокой плотности. Повреждающему эффекту липопротеинов высокой плотности можно противодействовать включением в липосомальный бислой соединений, повышающих вязкость мембраны липосом, таких как ХС и сфингомиелин. Так, обнаружена повышенная устойчивость к ферментативной деградации липосом, в состав которых входят эквимольная смесь фосфатидилглицерина и сфингомиелина [7]. Стабильность липосомальных средств доставки повышается и при использовании химических соединений, таких, как антиоксиданты и этилендиаминтетрауксусная кислота, способных ингибировать процессы перекисидного окисления липидов (ПОЛ) [5, 27, 30, 31].

Введение в состав мембраны заряженных липидов, длинноцепочечных анионных или катионных липидов приводит к увеличению межламеллярного пространства. При прочих равных условиях наличие в мембране липосом заряженного компонента приводит к увеличению включения лекарственных соединений с противоположным зарядом и замедляет их выход. В качестве минорного липосомообразующего компонента для формирования на липосомальной мембране отрицательного заряда чаще всего вводят дицетилфосфат и стеариновую кислоту. Отмечено и введение с этой целью фосфатидилэтанола. Внесение жирного амина обеспечивает суммарный положительный заряд липосом. Показано, что отрицательно заряженные липосомы продолжительнее и эффективнее взаимодействуют с клеточными структурами легких, чем нейтральные везикулы, и стимулируют более высокие показатели титров антител [32]; а такое соединение как инсулин, включенный в положительно заряженные липосомы, наименее доступен протеолитическим ферментам [33].

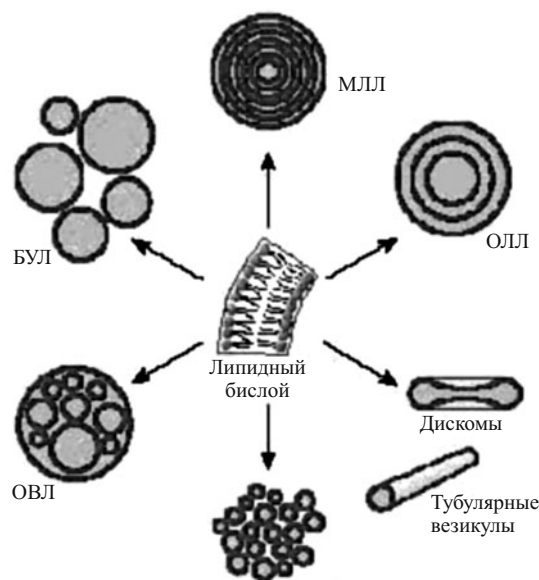


Рис. 2. Разнообразие липосом по строению и форме [16]: МЛЛ – мультиламеллярные липосомы; БУЛ – большие униламеллярные липосомы; ОВЛ – олиговезикулярные липосомы; МУЛ – малые униламеллярные липосомы; ОЛЛ – олиголамеллярные липосомы.

По строению липосомы разделяют на униламеллярные (УЛЛ), олиговезикулярные (ОВЛ) и мультиламеллярные (МЛЛ) [30].

Применение таких технологий как ультразвук, детергентный диализ и т.д. позволяет получать УЛЛ, причем их размеры варьируют: от 5 до 50 нм — малые УЛЛ липосомы и от 0,2 до 1 мкм — большие УЛЛ. Состав липосомообразующей смеси существенно влияет на размер получаемых везикул. Средний диаметр однослойных липосом из одного вида незаряженных ФЛ составляет примерно 25 нм. В случае же 2-компонентной смеси (ФЛ + ХС) диаметр липосом увеличивается до 35 нм [16, 30].

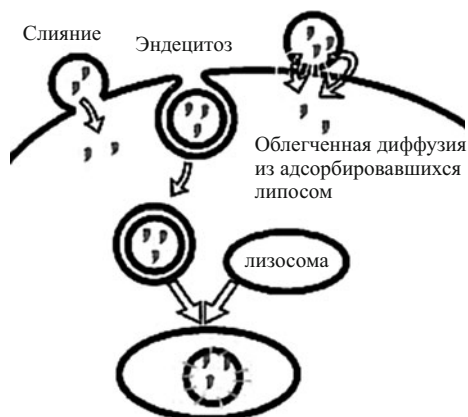


Рис. 3. Схематическое изображение основных путей проникновения содержимого липосом в клетку [14].

Наиболее мелкие фосфолипидные частицы с высокоразвитой поверхностью, с полярными группами снаружи и жирнокислотными цепями внутри — мицеллы, в отличие от липосом, не имеют внутреннего водного объема. Формы самоорганизации ФЛ в воде определяются зарядом их полярных головок и соотношением объемов, занимаемых головками и неполярными ацильными цепями. Когда эти объемы примерно одинаковы, т.е. когда молекулы липида имеют цилиндрические очертания, преобладает тенденция к образованию бислоя. Если же объем полярной головки больше объема ацильной части (как, например, у лизофосфатидилхолина), то молекула по форме приближается к обращенному конусу, и в водном окружении она будет находиться в виде мицелл [34].

Особый тип липосом, примыкающий к МЛЛ, так называемые ОВЛ, морфологически представляет собой шаровидные образования с внутренними гранулярными структурами: наружная мембрана такой липосомы состоит из липидного бислоя, а ее внутренняя часть разделена на отсеки бислойными мембранами [30].

Размер МЛЛ колеблется от 50 нм до нескольких десятков микрон, и состоят они из нескольких десятков, а то и сотен липидных бислоев, разделенных водной фазой [16]. В этом диапазоне располагается множество разнообразных липосомных структур, различающихся размерами, формой, числом липидных бислоев и внутренним устройством (рис. 2). Внешне липосомы не всегда выглядят как глобулярные частицы. Иногда они принимают уплощенную дискообразную форму (так называемые дискосомы или дискомы) или имеют вид очень длинных и тонких трубок, которые называют тубулярными липосомами.

Характерной особенностью фосфолипидных упорядоченных структур является их способность к фазовым переходам. Чистым индивидуальным ФЛ, как и многим химическим соединениям, свойственна определенная температура плавления (температура фазового перехода — $T_{ф.п.}$). При этой температуре осуществляется переход ФЛ из фазы упорядоченного геля в фазу менее упорядоченного, текучего, так называемого, жидкокристаллического состояния [35, 36]. $T_{ф.п.}$ фосфолипидов существенно зависит от структуры

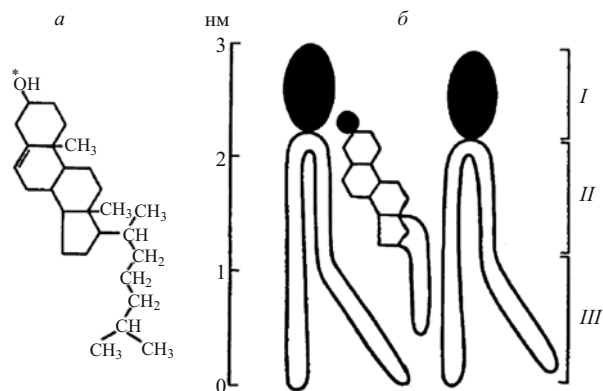


Рис. 4. Структурная формула холестерина (а), и его упаковка в бислой (б) [57]: I — область полярных головок; II — область, упорядочиваемая ХС; III — область более подвижных цепей. * — гидроксил, используемый для образования эфиров холестерина.

жирнокислотных цепей, увеличиваясь с ростом длины цепей и снижаясь при повышении степени их ненасыщенности. Сфинголипиды наиболее богаты длинными насыщенными жирнокислотными цепями, что создает условия для более плотной молекулярной упаковки, и поэтому они имеют сравнительно высокую $T_{ф.п.}$ В противоположность этому, у природных глицерофосфолипидов, содержащих обычно ненасыщенные ацильные цепи во втором положении глицеринового остатка, $T_{ф.п.}$ более низкая. Другие мембранные ФЛ, такие как фосфатидилсерин, фосфатидилглицерин или фосфатидилинозитол, также содержат ненасыщенные жирные кислоты и поэтому, подобно фосфатидилхолину, увеличивают жидкость образованных из них мембран.

Еще больше размеры и структура липосом, а, следовательно, количество включенных или связанных с ними лекарственных соединений, способность к их удержанию в течение определенного времени и характер взаимодействия везикул с клетками, зависят от ряда других факторов и, прежде всего, от способов получения липосом и характера встраивания в них биологически активных веществ, количественного и качественного состава липосомообразующих компонентов [27, 30, 36, 37].

Взаимодействие молекул с липосомами

Молекулы, которые необходимо включить в липосомы, могут взаимодействовать и связываться с различными участками в липосомальной везикуле. Так, макромолекулы, особенно белки, связываются с поверхностью липосом аналогично взаимодействию белков с биомембранами. Основная движущая сила взаимодействия имеет электростатическую природу. Высокополярные и сравнительно небольшие молекулы растворенных веществ включаются во внутреннее водное пространство; при этом важную роль играют электростатические взаимодействия [37]. Поэтому, используя различные факторы, влияющие на объем захвата внутрь липосом водной фазы, можно регулировать эффективность инкапсулирования водорастворимых лекарственных соединений.

Однако в случае гидрофобных веществ инкорпорирование их в липосомы происходит за счет встраивания в фосфолипидный бислой. Степень и место их связывания зависят от электростатических и гидрофобных взаимодействий, а эффективность инкапсулирования определяется “упаковочными” возможностями липидного бислоя. Отмеченная специфика встраивания гидрофобных веществ в липосомы может быть причиной существенных различий в эффективности их инкапсулирования. Эти различия связаны как с характером физико-химических взаимодействий между лекарством и компонентами липосомального “конверта”, так и со структурно-стерическими характеристиками самого лекарственного соединения [37]. Более того, конкретная локализация гидрофобного активного вещества внутри бислоя также может быть различной. Так, например, при изучении встраивания основных противотуберкулезных антибиотиков изониазида и рифампицина в большие УЛЛ, состоящие из фосфатидилхолина и фосфатидилглицерина с одинаковыми ацильными цепями, установлено, что изониазид локализуется вблизи поверхности липосомальной мембраны, тогда как рифампицин — внутри липидного бислоя вблизи метильных групп жирнокислотных остатков [38].

Ясно, что эффективность инкапсулирования гидрофобного соединения в липосомы можно повысить путем оптимизации состава липосомообразующей смеси. Этот же прием позволяет увеличить стабильность липосом (снизить скорость утечки лекарств из липосом в период их хранения) за счет возникновения ионных взаимодействий между молекулами лекарственного вещества и заряженными липидными компонентами [37]. Это видно на примере амфифильного противоопухолевого препарата доксорубинина, который эффективно взаимодействует с отрицательно заряженным ФЛ (кардиолипином) в составе липосом.

Лекарственные соединения, имеющие ионогенные группы, можно включать в липосомы с использованием трансмембранного потенциала ($\Delta\psi$) или протонного градиента на мембране (ΔpH) [30, 37]. Использование этого приема позволяет повысить эффективность включения в липосомы различных амфифильных лекарственных средств. В фармакологической практике для инкапсулирования лекарств чаще, однако, используют градиент pH. Это обусловлено тем, что если для создания трансмембранного потенциала в инкубационную среду необходимо вносить экзогенные ионофоры, то для ΔpH -зависимого инкапсулирования лекарств достаточно изменить pH инкубационной среды. Распределение лекарственных соединений между средой и липосомами происходит аналогично распределению слабых оснований. В непротонированной форме молекулы проникают через мембрану и накапливаются внутри везикул.

Несмотря на широкое использование липосом в самых различных областях экспериментальной биологии и медицины, нет единого мнения относительно способов их формирования. К настоящему времени

существует несколько десятков методов включения в липосомы лекарственных веществ.

Механизмы взаимодействия липосом с клетками и их использование для транспорта биологически активных соединений

Взаимодействие липосом с клетками начали активно изучать с конца 1970-х гг., были предложены следующие механизмы связывания липосомальной везикулы с клеточной мембраной и последующего проникновения внутрь: адсорбция, слияние и эндоцитоз [30, 39, 40].

Однако эта проблема не теряет своей актуальности, и поэтому исследования продолжают до настоящего времени, но уже с применением новейших методов [41 – 44]. Необходимо отметить, что результаты, полученные на современном этапе, не противоречат ранее полученным данным о механизмах взаимодействия липосом с живыми клетками, а лишь конкретизируют стадии их протекания. Так, например, установлено, что эндоцитоз включает следующие стадии — интернализацию, адсорбцию и слияние, и обусловлен гидрофобными взаимодействиями и нестабильными водородными связями, приводящими к потере воды в гидратной оболочке клеточной мембраны [42]. Рис. 3 демонстрирует, какими путями может обеспечиваться внутриклеточная доставка лекарственного средства из липосом.

Слияние — “**fusion**”. Липосомы могут слиться с мембранами клеток и стать их частью, при этом изменяются свойства клеточных мембран: например, их вязкость и проницаемость, величина электрического заряда [14, 30, 45]. Содержимое липосомы при этом выходит наружу. В зависимости от типа слияния оно может оказаться во внешней среде или попасть в цитоплазму. Очевидно, что в первом случае внутренний монослой липосомальной мембраны интегрируется с внешним монослоем плазматической мембраны. Во втором случае внутренний монослой мембраны липосом становится внутренним же монослоем мембраны клеток.

Адсорбция — “**adsorption**”. Еще одним способом взаимодействия липосомы с клеткой является адсорбция. Липосома может адсорбироваться на клеточной поверхности с последующей облегченной диффузией активного вещества через мембрану. Очевидно, что адсорбция должна быть предварительной стадией для таких процессов, как слияние или эндоцитоз. Однако адсорбцией может и заканчиваться весь процесс взаимодействия липосомы с клеткой. Разумеется, липосома не может пребывать на поверхности клетки “вечно”, в таком случае через некоторое время она десорбируется.

Эндоцитоз — “**endocytosis**”. Важная форма взаимодействия — поглощение липосомы клеткой (этот процесс “заглатывания” называется эндоцитозом) и вместе с ней внутрь клетки попадут те вещества, которые она доставила [14]. Это энергозависимый процесс, связанный с преобразованием энергии химических связей молекул АТФ в сократительную активность внутриклеточного актина и миозина [46].

Эндоцитоз начинается с формирования на плазматической мембране впячивания, которое, постепенно замыкаясь в пузырек, захватывает близлежащие компоненты наружной среды, в нашем случае липосому. Эндоцитозный пузырек вместе с захваченными компонентами транспортируется через цитоплазму к лизосоме, с которой он сливается. Следует отметить, что клетки значительно различаются по эндоцитозной активности [30, 39, 42]. Весьма интенсивно такие процессы проходят у макрофагов, что и позволяет их использовать в качестве объекта, на котором исследуются процессы эндоцитоза [43, 46, 47].

Наконец, иногда липосома может увеличить проницаемость плазматической мембраны — вызвать образование дополнительных каналов. Для описываемого способа взаимодействия характерно проникновение в клетку лишь содержимого липосом, при этом липидная фаза с клеткой не связывается [30].

Механизм проникновения липосом в клетку определяется размером получаемых везикул и их физическими свойствами, которые, в свою очередь, зависят от состава липосоμοобразующей смеси и технологии получения липосом. Малые липосомы (25 – 40 нм) более длительно циркулируют в крови и эндоцитируются в незначительном количестве, тогда как крупные везикулы (более 100 нм) быстро захватываются макрофагами и для них эндоцитоз — один из основных путей попадания в клетку [30, 39]. Кроме того, заряженные липосомы (как положительно, так и отрицательно) эффективнее поглощаются по сравнению с нейтральными липосомами как макрофагами, так и опухолевыми клетками, причем это предпочтение носит нелипидоспецифический характер.

Один из подходов повышения тропности липосом к клеткам-мишеням связан с использованием имеющихся на плазматических мембранах специфических рецепторов, способных узнавать терминальные углеводные остатки гликопротеидов [30]. Действительно, в ряде экспериментов показано, что захват липосом клетками заметно возрастает, если их получали из ФЛ и ганглиозидов органов-мишеней. Такие липосомы называют “аутологичными”.

Эффективным приемом придания липосомам специфичности к клеткам-мишеням является модификация их поверхности. Так, введение в состав стелс-липосом *o*-стеариламплопектина приводит к повышенному сродству к легочной ткани мышей. При создании “виросомы” в липосому включают кроме антигена (вирусный капсид) еще белки, способствующие слиянию мембран липосом и клеток, например, гемагглютинин вируса гриппа [14]. Он способствует связыванию с клеткой-мишенью и рецептор-опосредованному эндоцитозу. Заключение в эндосому виросомальный гемагглютинин, активированный кислым значением рН среды, способствует слиянию мембран “виросомы” и эндосомы и высвобождению содержимого липосомы в цитоплазму клетки-мишени. Именно такой путь считается предпочтительным для липосом, нагруженных генетическим материалом.

Оригинальным направлением в липосомологии явилась разработка нового поколения липосомальных лекарственных средств — иммунолипосом [48, 49]. Иммунолипосомы представляют собой липосомы, к которым прикреплены моноклональные антитела (МКА), обеспечивающие специфическое связывание липосом с антигенпозитивными клетками, в то время как сами липосомы несут соответствующий гидрофобный или гидрофильный химиотерапевтический препарат. В настоящее время говорят о 3 типах иммунолипосом: *A*, *B* и *C*. В иммунолипосомах типа *A* МКА ковалентно связаны с обычными липосомами посредством короткого якоря. Тип *B* — это уже пегилированные липосомы, в которых МКА также ковалентно связаны с ними посредством короткого якоря. Тип *C* (Pendant-type PEG-immunoliposomes) — это стерически стабилизированные стелс-липосомы, в которых МКА прикреплены к дистальному терминальному концу ПЭГ [25].

Для липосомальных лекарственных веществ описаны следующие пути введения в организм: внутривенный, внутримышечный, подкожный, ингаляционный, пероральный, парентеральный, эндовитреальный и наружный [18, 20, 42, 48, 50]. Известно, что способ введения липосом пациенту играет важную роль в развитии терапевтического эффекта.

К примеру, для лечения бронхолегочных заболеваний перспективным направлением является ингаляционный способ введения, при этом наиболее полно реализуются основные положительные свойства липосом (депонирование, пролонгация, протекция к инактивации) [10, 17, 27]. Попадая в легкие путем интратрахеального введения, липосомы в первую очередь взаимодействуют с легочными макрофагами, которые, как известно, поглощают и патогены.

Приемы стабилизации липосомальных форм лекарственных препаратов

Перспективы липосомальной терапии, т.е. использования липосом для направленной доставки лекарственных веществ в пораженные органы и ткани, определяются такими факторами как: *a*) эффективность инкорпорирования активного вещества в липосомы [9, 10, 37, 50]; *б*) стабильность липосомальных форм при хранении и их устойчивость в организме [22, 31, 37]; *в*) терапевтические преимущества липосомальных форм перед традиционными лекарственными препаратами [48, 50, 51].

Можно предположить, что эффективность инкапсулирования лекарственного активного вещества и стабильность его липосомальной формы будут определяться составом липосоμοобразующей смеси, методом формирования липосом и степенью подавления в липосомальной мембране и активном веществе процессов окислительной деструкции.

Следует отметить, прежде всего, что все этапы создания липосом проводят в атмосфере инертного газа, после чего полученную липосомальную форму лекарственного препарата лучше всего лиофильно высушить и хранить в запаянных ампулах. Этот прием

обеспечивает существенное снижение скорости развития процессов ПОЛ [37, 52 – 54]. Необходимо отметить, что при проведении лиофилизации необходимо учитывать строение бислоя везикул, температуру фазового перехода липида или смеси липидов, размеры везикул, тип криопротектора [53].

Важную роль в стабилизации липосом играет структурно-механический фактор [37]. Характер упаковки жирнокислотных цепей ФЛ в липидном бислое существенно зависит от их химической структуры [34, 55]. Так, пространственная организация и размер полярной области ФЛ влияют на плотность молекулярной упаковки, т.е. на пространственное расположение в мембране жирнокислотных цепей фосфолипидных молекул. Например, этаноламин конформационно занимает меньший объем, чем холин (в котором атомы водорода в аминогруппе заменены большими по объему метильными группами), что создает возможность более плотной упаковки ацильных цепей в бислое, содержащем фосфатидилэтаноламин (ФЭА), по сравнению с фосфатидилхолином. Более того, ФЭА может образовывать обширную сеть водородных связей, которые дополнительно повышают плотность упаковки жирнокислотных цепей [34].

Повышение прочности липосомального “контейнера” достигается введением в липидную смесь веществ, ограничивающих подвижность ацильных цепей ФЛ, например, ХС или сфингомиелина [22, 30, 34, 56]. Механизм стабилизирующего липосомальную мембрану действия сфингомиелина связан с тем, что его ацильные цепи в среднем длиннее, чем таковые у ФЛ, кроме того, они высоко насыщены, а имеющиеся двойные связи находятся в *транс*-конформации (в ненасыщенных жирнокислотных цепях других природных ФЛ атомы углерода находятся в *цис*-конформации). Введение сфингомиелина в липидный бислой, состоящий из природных глицерофосфолипидов, приводит к образованию в жирнокислотной цепи перегиба (кинк), разрыхляющего плотную упаковку, ван-дер-ваальсовское взаимодействие при этом ослабляется. Поэтому присутствие хотя бы одной единственной двойной связи достаточно для того, чтобы оказать выраженное влияние на физические свойства ФЛ [34]. Ранее было показано значительное повышение устойчивости липосом к действию ферментов плазмы крови при добавлении к везикулам из яичного фосфатидилхолина ХС или сфингомиелина.

Молекулы ХС, как и другие липидные молекулы, имеют полярную голову и вытянутую в длину неполярную часть [57]. Поэтому они хорошо встраиваются в бислоиные липидные структуры, образующие клеточные мембраны (рис. 4).

В липидном бислое молекула ХС ориентируется таким образом, чтобы ее гидроксильная группа находилась вблизи полярной группы молекулы ФЛ, а плоское жесткое стероидное ядро было локализовано в области жирнокислотных остатков. Таким образом, ХС участвует в регуляции текучести мембраны, препятствуя плотной упаковке углеводородных цепей и, тем са-

мым, снижая температуру плавления липидов. Внешне это проявляется в “расширении” области фазового перехода в липидном бислое [34, 55 – 57].

В жидкокристаллическом состоянии ХС повышает степень упорядоченной организации и снижает скорость движения углеводородных цепей ФЛ [34, 37]. Хотя атом водорода в ОН-группе циклопентаногидрофенантрена малоподвижен, в результате чего ХС напрямую не оказывает тормозящего действия на окисление ненасыщенных жирных кислот в составе ФЛ, однако снижение скорости развития ПОЛ за счет изменения плотности упаковки жирнокислотных цепей ФЛ при введении в липосомальную мембрану ХС позволили еще в начале 90-х гг. назвать Г. И. Клебанову холестерин “структурным антиоксидантом” [58]. Важно подчеркнуть, что действие стерина на липидный бислой зависит от его концентрации и фазового состояния ФЛ, а свойством “структурного антиоксиданта” он обладает лишь до определенного порогового уровня своего содержания в мембранах [55, 58]. Таким образом, ХС заметно влияет на организацию липидного бислоя, увеличивая его гетерогенность.

Долгое время считалось, что ХС в мембране, состоящей из нескольких видов ФЛ, действует как гомогенизирующий агент мембранной матрицы. Учитывая, что каждый из этих ФЛ имеет свою, отличную от других $T_{ф.п.}$, считали, что именно ХС благоприятствует смешиванию мембранных липидов при физиологической температуре, снижая до минимума различия между жидким и гелевым состоянием глицерофосфолипидов [34]. Но экспериментальные данные свидетельствуют о неравномерном распределении ХС внутри мембран, что приводит к образованию доменов, обогащенных и обедненных ХС и сфинголипидами [56, 59]. Гетерогенность липидов в плоскости мембраны является следствием образования различных ассоциаций липидных молекул, группирующихся согласно их физико-химическому соответствию. При этом в отдельных слоях мембраны (главным образом, в наружном) возникают латеральные липидные домены (“рафты”) – участки плотно упакованных молекул с относительно высокой молекулярно-упорядоченной фазой, “плавающие” в жидко-неупорядоченной фазе основного липидного матрикса.

Среди важнейших приемов повышения стабильности липосомальных препаратов большая роль принадлежит введению в состав липосом антиоксидантов, т.е. соединений, способных ингибировать ПОЛ [31, 60]. Вещества этой группы имеют подвижный атом водорода, вследствие чего реагируют со свободными радикалами, а также с катализаторами свободнорадикального окисления и, прежде всего, с ионами переменной валентности. Подвижность атома водорода обусловлена нестойкой связью с атомами углерода или серы. Ряд антиоксидантов не обрывает, а замедляет продолжение цепи свободнорадикального окисления, т.е. обладает пролонгирующим действием.

Антиоксиданты делят на 2 основные группы: водорастворимые и липорастворимые [31, 60]. К первой

группе относятся “антиоксидантные” ферменты, лиганды, серусодержащие аминокислоты, фенольные соединения и др. Однако наибольшее биологическое значение, по-видимому, имеют жирорастворимые полифенолы: токоферолы, убихиноны, некоторые стероидные гормоны.

Основное преимущество липофильных антиоксидантов обусловлено тем, что они локализуются непосредственно в липидных бислоях, где и развиваются окислительные процессы. В результате они могут вмешиваться в ход процесса на самых ранних стадиях, перехватывая первичные липидные радикалы и ослабляя действие на углеводородные цепи липидов факторов, инициирующих окислительную деструкцию [61, 62].

Необходимо отметить, что антиоксиданты фенольной природы способны к окислительно-восстановительным превращениям; в липидном бислое мембран они находятся преимущественно в более устойчивой форме: окисленной (хинонной) или восстановленной (фенольной, гидрохинонной) [63]. Так, для витаминов группы К наиболее устойчивой является хинонная форма, а для токоферолов — фенольная форма. Механизм антиокислительного действия хинонных антиоксидантов в липидном бислое заключается в следующем: хиноны ингибируют окислительные процессы, присоединяя свободные радикалы с образованием малоактивного фенольного радикала.

Важный вопрос, возникающий в связи с проявлением антиокислительных свойств антиоксидантов в мембранных системах, касается характера их локализации в липидном бислое. Большинство гидрофобных синтетических (ионол, нафтолы и др.) и ряд природных антиоксидантов (галлоновая кислота, ее производные и др.) не содержат длинных углеводородных цепей; гидрофильно-олеофильное соотношение этих соединений и их молекулярная конфигурация не позволяют им образовывать устойчивые структуры [64]. Эти антиоксиданты, подобно многим гидрофобным ароматическим соединениям, достаточно произвольно перемещаются в липидном бислое, контактируя с ненасыщенными связями углеводородных цепей мембранных ФЛ, где и могут взаимодействовать с радикалами липидов.

В отличие от этого длинноцепочечные антиоксиданты (токоферолы) обладают выраженными амфифильными свойствами. Вследствие этого они влияют на структурно-функциональные параметры мембраны не только за счет своих антиоксидантных свойств, но и способны непосредственно взаимодействовать с компонентами мембраны, стабилизируя липидный бислой [61].

Из обширного семейства токоферолов биологически наиболее активным является DL- α -токоферол — донор водородных ионов, его еще называют “жертвоприносящим” антиоксидантом. По химической структуре DL- α -токоферол можно отнести к классу экранированных фенолов, антиокислительное действие которых обусловлено подвижным водородом гидроксильной группы. При взаимодействии с активными свободными радикалами отрыв этого атома водорода и приводит к образованию малоактивного то-

кофероксильного радикала. Кроме того, молекула DL- α -токоферола стабилизирует мембраны благодаря специфическому взаимодействию между боковой углеводородной цепью и жирнокислотными цепями ФЛ [31, 61].

Помимо перечисленных выше общепризнанных антиоксидантов к веществам, обладающим аналогичными качествами, относят и некоторые другие соединения, механизм действия которых пока остается неизвестным, например, ФЛ и некоторые антибиотики. Отмечают [63], что фосфатидилхолин может образовывать синергетические пары с гидрохиноном и другими фенолами, в том числе и с токоферолами. Механизмов, объясняющих явление синергизма, предложено несколько [34, 63], но предпочтение одному из них отдать трудно.

Важно также отметить, что антиоксиданты способны проявлять и прооксидантные свойства [64, 65]. Основными выявленными на сегодняшний день факторами, определяющими возможность инверсии антиоксидантных свойств, являются концентрация самого антиоксиданта, концентрация и химическая структура субстрата окисления, а также длительность периода протекания процесса ПОЛ.

Таким образом, разработка способа формирования стабильного липосомального лекарственного препарата с высоким уровнем инкорпорирования активного вещества является непростой задачей в силу того, что необходимо учитывать все вышеперечисленные факторы.

ЛИТЕРАТУРА

1. K. Andrieux, P. Couvreur, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, **5**(1), 463 – 474 (2009).
2. R. J. Passarella, D. E. Spratt, A. E. Van der Ende, et al., *Cancer Res.*, **11**(70), 4550 – 4559 (2010).
3. Y. M. Park, S. J. Lee, Y. S. Kim, et al., *Immune Netw.*, **13**(5), 177 – 183 (2013).
4. Е. В. Тазина, К. В. Костин, Н. А. Оборотова, *Хим.-фарм. журнал*, **45**(8), 30 – 40 (2011); *Pharm. Chem. J.*, **45**(8), 481 – 490 (2011).
5. Г. Л. Гуревич, *Дис. докт. мед. наук*, Минск (1996).
6. Н. Л. Лепарская, Г. М. Сорокоумова, Ю. В. Сычева и др., *Вестник МИТХТ*, **6**(2), 37 – 42 (2011).
7. Н. М. Литвинко, *Тез. докл. II Междунар. конф.*, Минск (2006).
8. А. К. Сариев, Д. А. Абаимов, Р. Д. Сейфулла, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **73**(11), 34 – 38 (2010).
9. Е. А. Котова, А. П. Полозкова, Т. В. Денисова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **45**(12), 37 – 40 (2011); *Pharm. Chem. J.*, **45**(12), 746 – 749 (2012).
10. H. D. Han, Y. Byeon, H. N. Jeon, et al., *Nanoscale Res. Lett.*, **9**(1), 209 (2014).
11. Ю. А. Горячева, О. М. Векшина, В. А. Яшин и др., *Бюл. экперим. биол. и мед.*, **12**(141), 688 – 690 (2005).
12. R. Mo, Q. Sun, N. Li, C. Zhang, *Biomaterials*, **34**(11), 2773 – 2786 (2013).
13. G. Xia, Z. An, Y. Wang, et al., *Chem. Pharm. Bul.*, **61**(4), 390 – 398 (2013).
14. А. П. Каплун, Ле Банг Шом, Ю. М. Краснопольский и др., *Вопросы мед. химии*, № 1, 3 – 12 (1999).
15. P. Ye, W. Zhang, T. Yang, et al., *Int. J. Nanomedicine*, **9**, 2167 – 2178 (2014).
16. Л. И. Барсуков, *Соросовский образоват. ж.*, № 10 (1998).

17. M. Takenaga, Y. Ohta, Y. Tokura, et al., *Drug Del.*, **3**(15), 169 – 175 (2008).
18. Л. М. Кузякова, *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*, **1**(46), 74 – 79 (2005).
19. Д. А. Безруков, *Автореф. дис. канд. хим. наук*, Москва (2007).
20. M. Teshima, S. Fumoto, K. Nishida, et al., *J. Control Rel.*, **3**(112), 320 – 328 (2006).
21. Z. She, T. Zhang, X. Wang, et al., *Biomaterials*, **35**(19), 5216 – 5225 (2014).
22. Чан Тхи Хай Иен, Е. В. Игнатъева, А. П. Полозкова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **44**(6), 53 – 56 (2010); *Pharm. Chem. J.*, **44**(6), 337 – 340 (2010).
23. L. A. Davies, G. A. Nunez-Alonso, G. McLachlan, et al., *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.*, **25**(2), 97 – 107 (2014).
24. Е. В. Толчева, Н. А. Оборотова, *Рос. биотер. ж.*, **1**(5), 54 – 61 (2006).
25. А. Ю. Барышников, Н. А. Оборотов, *Совр. онкол.*, **2**(3), 44 – 46 (2001).
26. A. Gursoy, E. Kut, S. Ozkirimli, *Int. J. Pharm.*, **1 – 2**(271), 115 – 123 (2004).
27. И. М. Бушмакина, Н. И. Дроздова, М. А. Мартынова, *Хим.-фарм. журн.*, **45**(1), 51 – 53 (2011); *Pharm. Chem. J.*, **45**(1), 62 – 65 (2014).
28. M. Zaru, S. Mourtas, P. Klepetsanis, et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **3**(67), 655 – 666 (2007).
29. В. П. Краснов, М. А. Королева, Е. Л. Водовозова, *Успехи химии*, **8**(82), 783 – 814 (2013).
30. Л. Б. Марголис, Л. Д. Бергельсон, *Липосомы и их взаимодействие с клетками*, Наука, Москва (1986), сс. 82 – 144.
31. Е. В. Санарова, Е. А. Котова, С. Г. Гозеев и др., *Хим.-фарм. журн.*, **46**(3), 50 – 53 (2012); *Pharm. Chem. J.*, **46**(3), 192 – 195 (2012).
32. И. В. Архипенко, В. А. Невзорова, Б. И. Гельцер, *Тер. архив*, № 3, 78 – 81 (1998).
33. M. Niu, Y. Lu, L. Novgaard, W. Wu, *Int. J. Nanomedicine*, № 6, 1155 – 1166 (2011).
34. О. М. Ипагова, *Фосфоглив: механизм действия и применение в клинике*, ГУ НИИ БМХ РАМН, Москва (2005), сс. 11 – 83.
35. A. W. Shaw, M. A. McLean, *Sligar FEBS Let.*, № 556, 260 – 264 (2004).
36. Н. А. Оборотова, А. А. Виланская, В. И. Прокофьева, *Рос. биотер. ж.*, **1**(5), 62 – 70 (2006).
37. В. К. Матус, Г. Л. Гуревич, В. М. Царенков и др., *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук*, № 1, 131 – 141 (2000).
38. C. Rodrigues, P. Gameiro, M. Prieto, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1 – 3** (1620), 151 – 159 (2003).
39. Г. Грегориадис, А. Аллисон (ред), *Липосомы в биологических системах*, Медицина, Москва (1983), сс. 107 – 155.
40. J. Zipper, D. Sarrach, W. Halle, *Biomed. Biochim. Acta*, **47**(7), 713 – 719 (1988).
41. M. Halter, M. Antia, V. Vogel, *J. Control Rel.*, **1 – 3**(101), 209 – 222 (2005).
42. K. X. Ngo, H. Umakoshi, T. Shimanouchi, et al., *Colloids Surf B Biointerfaces*, **2**(73), 399 – 407 (2009).
43. M. S. Martina, V. Nicolas, C. Wilhelm, et al., *Biomaterials*, **28**(28), 4143 – 4153 (2007).
44. B. Pawlikowska-Pawlega, L. E. Misiak, A. Jarosz-Wilkoezka, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1838**(8), 2127 – 2138 (2014).
45. Z. Drulis-Kawa, A. Dorotkiewicz-Jach, J. Gubernator, et al., *Int. J. Pharm.*, **1 – 2** (367), 211 – 219 (2009).
46. А. А. Воробьев, *Микробиология и иммунология*, Медицина, Москва (2005), сс. 167 – 269.
47. D. L. Poelma, L. J. Zimmermann, H. H. Scholten, et al., *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, **3**(283), 648 – 654 (2002).
48. R. Pandey, S. Sharma, G. K. Khuller, *Indian J. Experim. biol.*, **6**(42), 562 – 566 (2004).
49. Е. В. Толчева, Н. А. Оборотова, *Рос. биотер. ж.*, **1**(3), 19 (2005).
50. Н. Л. Лепарская, Г. М. Сорокоумова, Ю. С. Сычева и др., *Вестник МИТХТ*, **6**(2), 37 – 42 (2011).
51. K. Hirota, T. Hasegawa, H. Hinata, et al., *J. Control Rel.*, **1**(117), 69 – 71 (2007).
52. A. R. Mohammed, V. W. Bramwell, A. G. Coombes, et al., *Methods*, **1**(40), 30 – 38 (2006).
53. О. Ю. Аршинова, Е. В. Санарова, А. В. Ланцова, Н. А. Оборотова, *Хим.-фарм. журн.*, **46**(4), 29 – 34 (2012); *Pharm. Chem. J.*, **46**(4), 228 – 233 (2012).
54. И. М. Бушмакина, Н. И. Дроздова, М. А. Мартынова, *Биомед. химия*, **2**(55), 177 – 184 (2009).
55. А. В. Рубин (ред.), *Проблемы регуляции в биологических системах*, НИЦ “Регулярная и хаотическая динамика”, Москва – Ижевск (2006), сс. 82 – 103.
56. J. K. Silvius, *Biochim. Biophys. Acta*, № 1610, 174 – 183 (2003).
57. А. А. Болдырев, Е. А. Кяйвярайнен, В. А. Илюха, *Биомембранология: учеб. пособие*, Кар НЦ РАН, Петрозаводск (2006), сс. 18 – 56.
58. Г. И. Клебанов, *Автореф. дис. докт. биол. наук*, Москва (1991).
59. D. A. Brown, E. London, *J. Biol. Chem.*, № 275, 17221 – 17224 (2000).
60. В. Г. Зайцев, О. В. Островский, В. И. Закревский, *Эксперим. клин. фармакол.*, **4**(66), 66 – 70 (2003).
61. Р. П. Евстигнеева, И. М. Волков, В. В. Чудинова, *Биол. мембраны*, **2**(15), 119 – 136 (1998).
62. B. Li, J. R. Narjani, N. S. Cormieret, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **4**(135), 1394 – 1405 (2013).
63. Е. Б. Бурлакова, С. А. Крашаков, Н. Г. Храпова, *Биол. мембраны*, **2**(15), 137 – 167 (1998).
64. J. Atkinson, R. F. Erand, R. M. Erand, *Free Radic Biol. Med.*, **5**(44), 739 – 764 (2008).
65. M. L. Sagrista, A. E. Garcia, M. Africa De Madariaga, et al., *Free Radic. Res.*, **3**(36), 329 – 340 (2002).

Поступила 04.12.13

XXI CENTURY: HOW OUR NOTIONS ABOUT LIPOSOMAL DRUGS HAVE BEEN TRANSFORMED

I. M. Bushmakina, M. A. Martynova, and E. V. Knyazeva

Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Modern concepts of the development of nanosized liposomal carriers of drugs are reviewed. The history of studying the structure and composition of liposomes, their interaction with other molecules, and operation as reservoirs for drug delivery systems are briefly outlined. Medical advantages of liposomal drugs as compared to standard formulations are considered. Methods for increasing the efficiency of drug inclusion into liposomes, stabilization of liposomal compositions, and mechanisms of their interaction with cells are discussed.

Keywords: liposomes; lipid peroxidation; cholesterol; antioxidants.