

*Как устроены липосомы (1 балл)?*

**Липосомы** (от греч. *lipos* - жир и *soma* - тело) (липидные везикулы)— **искусственно получаемые частицы, образованные одним или несколькими концентрическими замкнутыми липидными бислоями, аналогичными по строению с липидной компонентой биологических мембран**, при этом внутренний водный объем липосом изолирован от внешней среды. В липосомах внутренняя водная фаза отделена от внешнего раствора. Такая организация позволяет использовать липосомы для исследования барьерных свойств липидного бислоя и некоторых других специальных задач.

*Приведите свою классификацию липосом и укажите, какие из них являются наноструктурами, аргументируйте свой ответ (2 балла).*

В зависимости от размера частиц и числа образующих их липидных слоев различают следующие типы липосом: **мультиламеллярные (многослойные) и моноламеллярные (однослойные) липосомы.**

Мультиламеллярные липосомы состоят из нескольких концентрических липидных бислоев. Их средний диаметр в зависимости от приготовления составляет 0,3-0,4 мкм или даже достигать нескольких микрон (до 10) в диаметре. Таким образом, **мультислойные липосомы не могут быть отнесены к наночастицам. Однако, поскольку толщина липидного бислоя составляет менее 10 нм, можно определить такие частицы как микрочастицы, имеющие наноструктурированную поверхность.** Мультиламеллярные липосомы осмотически активны: они изменяются в объеме при изменении осмотических свойств внешней среды.

Моноламеллярные липосомы состоят из одного бислоя. Различают малые моноламеллярные (диаметр 20-50 нм) и крупные моноламеллярные, (диаметр 50-200 нм и выше). Согласно определению ИЮПАК, наночастицами являются частицы с размерами 100 и менее нм, поэтому **моноламеллярные липосомы можно отнести к наночастицам.** Моноламеллярные липосомы широко и эффективно используют в разнообразных исследованиях биологического и медико-биологического характера а также различных био(нано)технологических процессах.

Также возможна классификация веществ в зависимости от типа веществ, входящих в состав липосом: например если в состав липосом входят белки их называют **протеолипосомы.** Кроме того возможно классифицировать липосомы в зависимости от **формы:** шарообразные, дискообразные, неправильной формы (если в состав липосомы инкорпорирована твердая частичка), тубулярные липосомы; **поверхностного заряда:** положительно нейтрально или отрицательно заряженные; **морфологии поверхности:** гладкие, негладкие; **наличию осмотической активности:** осмотически активные или неактивные и др.

*Известно, что в состав липосом входят холестерин, лецитин и полиэтиленгликоль. Какие свойства придают эти компоненты липосоме?*

Наличие холестерина в липидном бислое приводит к увеличению жесткости мембран липосом, уменьшает текучесть липидного бислоя и ограничивают проницаемость липидных мембран для малых водорастворимых молекул, а также увеличивает упругость и механическую прочность бислоя. Таким образом, присутствие холестерина способствует увеличению стабильности липосомы.

Лецитин (здесь используется как синоним фосфолипида фосфатидилхолина) — один из основных четырех мембранообразующих фосфолипидов в мембранах живых клеток. Фосфатидилхолин является наиболее распространенным фосфолипидом в мембранах клеток, достаточно легко способен к самопроизвольному образованию

липидного бислоя в водной среде. Это что делает его наиболее одним из наиболее удобных веществ для изготовления липосом. При некоторых методах приготовления однослойных липосом из различных фосфолипидов, молекулы фосфатидилхолина обнаруживаются главным образом, в наружном монослое, что, вероятно, определяет ассиметричное расположение некоторых белков, встроившихся в бислой.

Полиэтиленгликоль (очень часто при работе с липосомами используются конъюгаты содержащие остатки фосфолипидов, например фосфатидилэтаноламина, и полиэтиленгликоля, что обеспечивает лучшее проникновение таких молекул в бислой) — полимер с гибкой гидрофильной цепью, содержащей различное количество звеньев, в зависимости от условий синтеза. Это вещество является универсальным стабилизатором, достаточно слабо взаимодействующим с мембранами (концевыми заряженными группами) и действующим независимо от липидного состава липосом, наличие полиэтиленгликоля приводит к экранированию поверхностного заряда липосом. Кроме того молекулы ПЭГ создают в примембранной области избыточное осмотическое давление, что позволяет загружать в липосомы больше вещества, предотвращая осмотический разрыв. Одной из основных причин использования полиэтиленгликоля является его способность предохранять липосомы от поглощения их макрофагами, что приводит к увеличению времени циркуляции в кровеносном русле и способствует накоплению в тканях-мишенях (напр., различных опухолях).

*Исходя из перечисленных характеристик липосом, предложите возможные методы или приборы для их определения и дайте обоснование выбора того или иного метода.*

При помощи липосом решаются различные задачи, соответственно, в зависимости от типа задачи необходимо использовать методы, оценивающие различные характеристики липосом. Ниже очень кратко приведено описание нескольких таких методов.

Так, при необходимости оценки **формы и морфологии** образцов используют различные виды микроскопий. При этом в случае оценки липосом малых (нано)размеров используются различные **электронные микроскопы** (при этом образцы, как правило, разрушаются); **сканирующие зондовые микроскопы**, напр., **атомно-силовые** (в этом случае используются как фиксированные липосомы, так и, особенно в последнее время, форма и размер липосом оценивается *in situ*, без дополнительного воздействия); различные виды **лазерных интерференционных микроскопов**, позволяющих *in situ* оценить форму и состояние отдельной липосомы. Для оценки липосом микронных размеров можно использовать различные разновидности **фазово-контрастной микроскопии**, поскольку, как правило, препараты на основе липосом обладают очень низкой контрастностью.

Вышеописанные микроскопические методы с высокой точностью позволяют оценивать форму и состояние отдельных липосом, однако они мало пригодны для массовых поточных исследований или тестов препарата. Поэтому для оценки **среднего размера липосом** обычно используются различные разновидности метода **динамического светорассеяния**. Основная трудность здесь состоит в корректном использовании заложенных методик при оценке частиц субмикро- и наноразмеров. Существует ряд приборов позволяющих это сделать с достаточно высокой точностью (напр., Submicron Particle Sizer в различных модификациях).

Используя метод **динамического светорассеяния** в сочетании с **электрофоретическими** методами можно оценивать такие характеристики липосом как **подвижность** и **поверхностный заряд**.

Используя различные **флуоресцентные красители** можно оценить величину **заряда поверхности** (в довольно грубом приближении), **вязкость**, а также ряд других характеристик мембран и веществ, инкорпорированных в липосомы.

Метод **электронного парамагнитного резонанса** позволяет оценить изменение **вязкости** мембран липосом не только локально (в плоскости), но также и оценить профиль изменения вязкости внутри липидного бислоя.

Для **оценки состояния инкорпорированных в липосомы веществ на молекулярном уровне** используется **спектроскопия комбинационного рассеяния (рамановская спектроскопия)**.

Для оценки **количества вещества**, загруженного в липосомы, можно использовать различные **аналитические методы**, например, различные методы хроматографии, **после разрушения липосом**.

При использовании липосом для введения различных веществ в живые организмы, включая людей, необходимо оценивать **стерильность** используемых растворов липосом. Проще всего это сделать поместив бактерии в питательную среду, благоприятствующую росту различных микроорганизмов, и после некоторого времени оценить количество образовавшихся бактерий. В настоящее время все большую популярность получает использование методов генной инженерии для определения микроорганизмов по наличию специфических ДНК или белков в растворах липосом.

Для **разделения липосом по фракциям или отделения липосом, содержащих некое вещество, от этого же вещества, находящегося в том же растворе** используют **ультрацентрифугирование** или различные **хроматографические методы**.

При работе с живыми организмами очень важно оценивать **токсичность** образцов, различных препаратов, созданных на основе липосом. Традиционно, в первую очередь, оценивают **острую токсичность** препаратов для оценки полулетальной дозы (ЛД50) — концентрации вещества при которой половина объектов, подвергшихся действию препарата, погибает. Для оценки более долговременного действия препаратов проводятся более длительные исследования, направленные на более точную оценку состояния организмов, подвергшихся действию препаратов.

Характеристики липосом	Методы определения/приборы
Форма липосом и морфология поверхности	Трансмиссионная электронная микроскопия, электронная микроскопия по методу замораживания-скальвания
Средний диаметр липосом и распределение по размерам	Динамическое светорассеяние, фотонная корреляционная спектроскопия, лазерное светорассеяние, гель-фильтрация
Поверхностный заряд	Свободный электрофорез
Поверхностный электрический потенциал	Измерение дзета-потенциала
Количество липидных бислоев	Малоугловое рентгеновское рассеяние, <sup>31</sup> P-ЯМР, электронная микроскопия по методу замораживания-скальвания
Устойчивость двойного слоя липидов	Электронная микроскопия по методу замораживания-скальвания, дифференциальная сканирующая колориметрия
Эффективность инкапсулирования (процент невключившегося препарата/процент включения)	Центрифугирование, ионообменная хроматография, тест с использованием радиометки, гель-фильтрация с последующим спектрофотометрическим определением эффективности инкапсулирования
Высвобождение препарата <i>in vitro</i>	Диализ, спектрофлуориметрия
Концентрация фосфолипидов	ВЭЖХ
Концентрация холестерина	ВЭЖХ, холестерин-оксидазный метод
Перекисное окисление	УФ-спектрофотометрия, йодометрическое титрование

фосфолипидов	
Гидролиз фосфолипидов, самоокисление холестерина	ВЭЖХ и ТСХ
Осмолярность	Осмометр
Стерильность	Тест с использованием анаэробных и аэробных культур
Пирогенность	LAL-тест, испытания на кроликах
Токсичность	По выживаемости животных, гистопатологическое определение

*Для каждого из перечисленных препаратов подберите наиболее подходящий метод (методы) загрузки в липосомы, объясните свой выбор (2 балла):*

1. доксорубицин
2. ибупрофен
3. индометацин
4. циклоспорин
5. пилокарпин
6. винкристин
7. пироксикам
8. тимолол
9. дофамин
10. ципрофлоксацин
11. этинефрин
12. хинин
13. кодеин
14. лидокаин
15. налидиксовая кислота

После спонтанной перегруппировки безводных фосфолипидов в присутствии воды в гидратированную бислойную структуру часть водной фазы захватывается внутрь замкнутой бислойной структуры. С помощью этого процесса водорастворимые вещества пассивно загружаются в липосомы. Кроме пассивного инкапсулирования существуют методы активной загрузки, к которым относятся: метод рН-градиента через липидную мембрану, загрузка с помощью градиента сульфата аммония, градиента ацетата кальция или натрия, градиента иона переходного металла и трансмембранного фосфатного градиента.

Загрузка за счет различных градиентов используется для конкретных препаратов, которые могут находиться как в заряженной, так и в незаряженной форме в зависимости от рН среды. Такие вещества можно добавлять в водную фазу в незаряженном состоянии для проникновения внутрь липосом через липидный бислой. Далее внутри липосом устанавливается значение рН, необходимое для возникновения заряда на молекуле вещества. Заряженные молекулы не способны пройти через липидный бислой и вернуться во внешнюю среду.

Слабые амфифильные основания загружают в липосомы с помощью градиента рН, а также ионных градиентов неорганических солей аммония и трансмембранного фосфатного градиента. Загружаемое основание в нейтральной форме способно проникать через бислой, однако, приобретая положительный заряд в кислой среде внутреннего объема липосом, почти полностью теряет эту способность, т.к. коэффициент проницаемости для заряженной молекулы значительно меньше, чем для незаряженной. Этот процесс можно описать как обмен через мембрану аммиака и загружаемого основания (антипорт).

К амфифильным соединениям со слабыми основными свойствами относятся: доксорубицин, пилокарпин, винкристин, тимолол, дофамин, эpineфрин, хинин, кодеин, лидокаин и др.

Для загрузки слабых кислот используется градиент ацетата кальция; в этом случае движущей силой загрузки является антипорт уксусной кислоты и загружаемой слабой кислоты.

К соединениям со слабыми кислотными свойствами относятся: ибупрофен, индометацин, пироксикам, ципрофлоксацин, налидиксовая кислота и др.

Соединения, растворимые в органических растворителях (циклоспорин), распределяются в двойном слое липидов. Такие соединения растворяют вместе с фосфолипидами в подходящем органическом растворителе. Полученную смесь вначале высушивают под вакуумом до полного удаления растворителя, а затем к ней непосредственно добавляют водную фазу.

*(Альтернативный ответ: Липосома состоит из гидрофобного липидного бислоя, который отделяет внутренний водный объем от внешней среды. Соответственно, если вещество, которое необходимо загрузить в липосому гидрофильно, то его помещают во внутренний объем, если гидрофобно, то оно может оказаться в липидном бислое. Обычно для переноса водорастворимых веществ используются крупные моноламеллярные липосомы, поскольку для них удается достичь наибольшей величины внутреннего объема при сохранении стабильности. Для гидрофобных веществ, накапливающихся в липидном бислое, гораздо выгоднее использовать малые моноламеллярные и многослойные липосомы.*

К гидрофильным веществам, предложенным в вопросе, относятся: доксорубицин, циклоспорин, пилокарпин, винкристин+, дофамин, ципрофлоксацин, эpineфрин, кодеин, лидокаин; к гидрофобным: ибупрофен, индометацин, пироксикам, тимолол (гель), хинин, налидиксовая кислота;

Вводить вещества в липосомы можно на стадии их получения или позднее, водорастворимые вещества можно загружать во внутренний объем липосом при помощи создания осмотического градиента.

Так, традиционный способ загрузки водорастворимых веществ в липосомы основан на регидратацию липидных пленок в присутствии буфера, содержащим исходные вещества. При правильном подборе компонентов и оптимальных условий проведения процедуры эффективность введения препарата составляет более 50%.

В случае гидрофобных веществ, хорошо растворимых в липидном бислое, целесообразным является добавление необходимых веществ прямо в липидную фазу, после чего следуя стандартной процедуре формирования липосом. Разумеется, следует учитывать возможность взаимодействия вводимых веществ с детергентами, иногда используемыми для формирования липосом. Например, ряд водорастворимых гидрофильных препаратов (напр. Пилокарпин и тимолол) смешивают с растворителем, содержащем фосфолипиды (или другими компонентами липосом), и затем получают из этой смеси эмульсию. После удаления растворителя из эмульсии формируется нестабильный, содержащий водорастворимое вещество, липидный монослой из которого можно получить липосомы с высоким содержанием лекарства внутри.

Помимо этого, используя ряд методических приемов, можно достичь высокой эффективности загрузки искомых веществ в липосомы. Так, в частности, для амфифильных веществ (напр., доксорубицин, пилокарпин, тимолол, дофамин, эpineфрин, хинин, кодеин и лидокаин) используется разница в проницаемости мембраны для нейтральных (несущих суммарный нулевой заряд) и заряженных форм молекул. Незаряженные молекулы более гидрофобны и лучше растворимы в липидной мембране клеток и липосом. При добавлении таких веществ в раствор, содержащий липосомы, они по градиенту концентрации будут проникать внутрь липосом через мембрану. Если при

этом подкислить внутренний объем липосом, то проникшие в него нейтральные молекулы присоединяют протон, приобретают положительный заряд и, в результате, эффективность их выхода из внутреннего объема липосом резко снижается. Наиболее распространенный способ создания протонного градиента (увеличения количества протонов во внутреннем объеме липосом) это помещение липосом в раствор, содержащий ионы аммония  $\text{NH}_4^+$ . Данные ионы проникают по градиенту концентрации во внутренний объем липосом пока концентрация между ним и наружным объемом не выровняется, затем разбавлением уменьшают концентрацию ионов аммония во внешнем растворе. Это приводит к диффузии нейтральных молекул аммиака во внешний объем, что приводит к подкислению внутреннего объема липосом.)

### **Каким образом используются липосомы в био(нано)технологии?**

В настоящее время липосомы являются одним из наиболее активно используемых средств доставки различных веществ, включая растительные препараты к живым клеткам. Основным преимуществом липосом перед другими средствами доставки является сходство липосом с природными мембранами клеток по химическому составу, поскольку главным компонентом мембран живых клеток являются фосфолипиды. Кроме того, благодаря относительно простой процедуре изготовления липосом можно широко варьировать их размеры, характеристики, состав поверхности, что позволяет использовать липосомы для транспорта широкого круга фармакологически активных веществ: противоопухолевых и противомикробных препаратов, гормонов, различных ферментов, вакцин, а также дополнительные источники энергии для клетки (например Q10), и генетический материал (нуклеиновые кислоты), а также позволяет адресно доставлять вещества к тканям и клеткам. Липосомы сравнительно легко разрушаются в организме, высвобождая доставленные вещества, при этом до взаимодействия с клетками, липосомы защищают свое содержимое от контакта с иммунной системой, что может вызвать последующее разрушение данного вещества и/или стать причиной развития аллергических реакций. Используя липосомы можно доставлять до тканей-мишеней водонерастворимые или токсичные вещества (например, если возникает необходимость доставить ядовитые вещества к клеткам опухолей, не повреждая при этом здоровые клетки). Таким образом, липосомы помогают дольше сохранять высокий уровень концентрации лекарственных препаратов в крови и клетках, а также помогают веществам проникать к тканям и клеткам, недоступным для этих веществ при обычном способе доставки в организм.

В настоящее время липосомы широко используются в косметологии как основа для различных кремов, наносимых на кожу и волосы, а также в пищевой промышленности (напр. в сыроварении, хлебопечении и производстве кондитерских изделий), а также в ряде других областей.

Помимо этого липосомы по-прежнему остаются удобным экспериментальным объектом, моделью клеточной мембраны, используемой для проведения различных исследований (оценка транспорта веществ, процессов слияния, работы различных каналов и др.).