

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Факультет радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем

«До захисту»

Завідувач кафедри молекулярної і  
медичної біофізики

Д.ф.-м.н., доцент кафедри  
молекулярної і медичної біофізики

\_\_\_\_\_ Володимир БЕРЕСТ

“ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 20\_\_ року

**ДИПЛОМНА РОБОТА МАГІСТРА**

**ФІЗИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛПОСОМАЛЬНИХ КОНТЕЙНЕРІВ  
ДОСТАВКИ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН**

Науковий керівник

к.б.н., доцент кафедри молекулярної

і медичної біофізики

\_\_\_\_\_ Лариса СІЧЕВСЬКА

Виконав студент групи РБ-61

Спеціальності:

105 - Прикладна фізика та наноматеріали \_\_\_\_\_ Ігор ПЕРЕПЕЛИЦЯ

Харків 2022

## РЕФЕРАТ

Перепелиця І.А. Фізичні характеристики ліпосомальних контейнерів доставки біологічно активних речовин. Дипломна робота. Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, 2022. 56 стр., 19 рис., 31 джерело.

ЛПОСОМИ, ЛПІДНІ КОНТЕЙНЕРИ, БЛОК-ЛПІДНІ КОМПЛЕКСИ, ТАРГЕТНА ДОСТАВКА АКТИВНИХ РЕЧОВИН.

Об'єкт дослідження: Ліпосомальні контейнери з біологічно активними речовинами.

Предмет дослідження: Модернізація ліпосом для кращого захоплення та таргетного перенесення до клітин активних речовин.

Мета роботи: проаналізувати останні напрацювання у сфері отримання ліпосомальних контейнерів та їх застосування з метою цільової доставки біологічно активних речовин

Результати дослідження: Модифікації ліпідних бішарів молекулами холестерину сприяє формуванню ліпідної упаковки різної щільності, що в свою чергу впливає на стабільність ліпосомальних контейнерів щодо дії рН та температури навколишнього середовища. Модернізації ліпосомальних везикул різними типами пептидів дозволяє «пасивно націлювати» ліпосомальні контейнери на групу клітин для подальшого вивільнення біологічно активної речовини, уникаючи при цьому контакту з нецільовими клітинами.

## ABSTRACT

Perepelytsia I.A. Physical characteristics of liposomal containers for delivery of biologically active substances Graduate work. V. N. Karazin Kharkiv National University, 2022. 56 p., 19 images, 31 references.

LIPOSOMES, LIPID CONTAINERS, PROTEIN-LIPID COMPLEXES,  
TARGETED DELIVERY OF ACTIVE SUBSTANCES

Object: liposomal containers with biologically active substances.

Subject: modernization of liposomes for better capture and targeted transfer of active substances to cells.

Aim: to analyze the latest developments in the field of obtaining liposomal containers and their use for the purpose of targeted delivery of biologically active substances.

Results: modification of lipid bilayers by cholesterol molecules contributes to the formation of lipid packaging of different densities, which in turn affects the stability of liposomal containers in relation to the effect of pH and environmental temperature. Modernization of liposomal vesicles with different types of peptides allows for "passive targeting" of liposomal containers on a group of cells for further release of biologically active substances, while avoiding contact with non-target cells.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
1. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ МОДЕЛЬНИХ ЛІПОСОМАЛЬНИХ МЕМБРАН ПОТЕНЦІЙНИХ КОНТЕЙНЕРІВ ДОСТАВКИ БАР	7
1.1 Фізико-хімічні властивості модельних ліпосомальних мембран	7
1.2 Особливості процесу самозбирання ліпідних контейнерів	15
2. МОДИФІКАЦІЯ ФІЗИЧНОГО СТАНУ МОДЕЛЬНИХ ЛІПІДНИХ МЕМБРАН	23
2.1 Вплив температури та рН середовища на ліпосомальні контейнери	23
2.2 Модифікація ліпосомальних контейнерів молекулами холестерину	25
3. ЛІПОПРОТЕІНОВІ КОМПЛЕКСИ ЯК ФАКТОР МОДИФІКАЦІЇ МОДЕЛЬНИХ МЕМБРАН	29
3.1 Взаємодія пептидів з ліпосомальними контейнерами	29
3.2 Використання пептидів для таргетної доставки активних речовин ліпосомальними контейнерами	32
4. МЕТОДИ МОДЕЛЮВАННЯ ЛІПІДНИХ КОНТЕЙНЕРІВ	38
4.1 Формування ліпосом методом екструзії	38
4.2 Завантаження ліпосом пептидом ТАТ	36
4.3 Формування ліпідних контейнерів методом ультразвукової обробки	39
4.4 Завантаження ліпідних контейнерів ICG	40
4.5 Мішені для цільової доставки БАР в складі ліпідних контейнерів	41
5. ЛІПОСОМАЛЬНІ КОНТЕЙНЕРИ ЯК ПОТЕНЦІЙНІ ЗАСОБИ ДОСТАВКИ БАР	42
5.1 Властивості ліпосом для перенесення барвника ICG в клітини	42
5.2 Властивості ліпосом з вмістом пептиду ТАТ для перенесення БАР	45
6. ВИСНОВКИ	52
7. СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	53

## ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

БАР- біологічно активні речовини

DDS - системи доставки (ліків/ біологічно активних речовин).

SA - самоскладання.

T<sub>m</sub> - температура фазового переходу.

ЛП - ліпосоми

MPS- система монопуклеарних фагоцитів

ULV- одношарові везикули

GUV- гігантські одношарові везикули

LUV- малі одношарові везикул

MLV - багатшарові везикули

OLV- оліголамельярні везикули

ПЕГ- поліетиленгліколь

DSPG - 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфо-рас-глицерол

PC- фосфатидилхолін

PE- фосфатидилетаноламін фосфатидилсерин

PI-фосфатидилінозит

PG- фосфатидилглицерин

PA- фосфатидна кислота

MES- етансульфонова кислота

ICG- індоціаніновий зелений

## ВСТУП

На даний час в науковій дослідницькій і медичній практиці модельні мембрани, ліпосомальні контейнери ефективно використовуються для цілеспрямованого транспорту лікарських препаратів, в тому числі і для терапії онкологічних захворювань, як ідеально біосумісні носії, які деградують природним чином в організмі.

Відомо, що завантаження біологічно активних речовин в ліпідні контейнери забезпечує селективну доставку адекватних концентрацій захоплених біологічно активних речовин до місця їх активності, одночасно обмежує їх доставку до нецільових тканин та збільшує при цьому терапевтичний коефіцієнт біологічно активної речовини.

В процесі свого розвитку ліпосоми перейшли від звичайних везикул до «ліпосом другого покоління», до яких відносять ліпосоми, модифіковані за рахунок модуляції ліпідного складу, розміру та заряду везикул. Внутрішні переваги ліпосом, такі як біосумісність, низька токсичність, висока здатність до навантаження та контрольована кінетика вивільнення, дало змогу дослідникам вважати ліпосоми одним із найперспективніших інструментів для таргетування біологічно активних речовин у галузях біології та медицини.

Метою роботи було здійснення наукового пошуку, аналіз наукових експериментальних даних та узагальнення світового досвіду, щодо новітніх методик створення та модернізації ліпідних контейнерів, як надійних засобів таргетної доставки біологічно активних речовин.

# 1 ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ МОДЕЛЬНИХ ЛІПОСОМАЛЬНИХ МЕМБРАН ПОТЕНЦІЙНИХ КОНТЕЙНЕРІВ ДОСТАВКИ БАР

## 1.1 Фізико-хімічні властивості модельних ліпосомальних мембран

Фософоліпідна молекула має гідрофобний хвіст і гідрофільну головку, що призводить до утворення амфіфільної структури. Ліпосоми можуть бути виготовлені як з природних, так і з синтетичних фосфоліпідів. Склад ліпідів сильно впливає на характеристики ліпосом, такі як: розмір частинок, жорсткість, плинність, стабільність та електричний заряд. Наприклад, ліпосоми, виготовлені з природного ненасиченого фосфатидилхоліну, як ячний або соєвий фосфатидилхолін, забезпечують високу проникність і низьку стабільність. Хоча ліпосоми на основі насичених фосфоліпідів, таких як дипальмітоїлфосфатидилхолін, призвели до жорстких і майже непроникних двошарових структур [1].

Гідрофільна група в ліпідах може бути негативно, позитивно зарядженою або цвіттеріонною (як негативний, так і позитивний заряд в одній молекулі). Заряд гідрофільної групи забезпечує стабільність завдяки електростатичному відштовхуванню. Гідрофобна група ліпідів відрізняється довжиною ацильного ланцюга, симетрією та насиченістю [2].

Для приготування ліпосом в експериментальній практиці використовують набір ліпідів максимально наближений до хімічного складу природних мембран. Природні фосфоліпіди можна отримати з різних джерел, таких як соєві боби, ячний жовток [1]. Мембранний подвійний шар нормальних клітин в основному складається з гліцерофосфоліпідів. Природні фосфоліпіди є менш стабільними, ніж синтетичні фосфоліпіди в препараті ліпосом через ненасичені характеристики вуглеводневого ланцюга. Природні фосфоліпіди (рис. 1.1), що складаються з різноманітних жирних кислот, одна з яких є насиченою жирною кислотою, як пальмітинова кислота

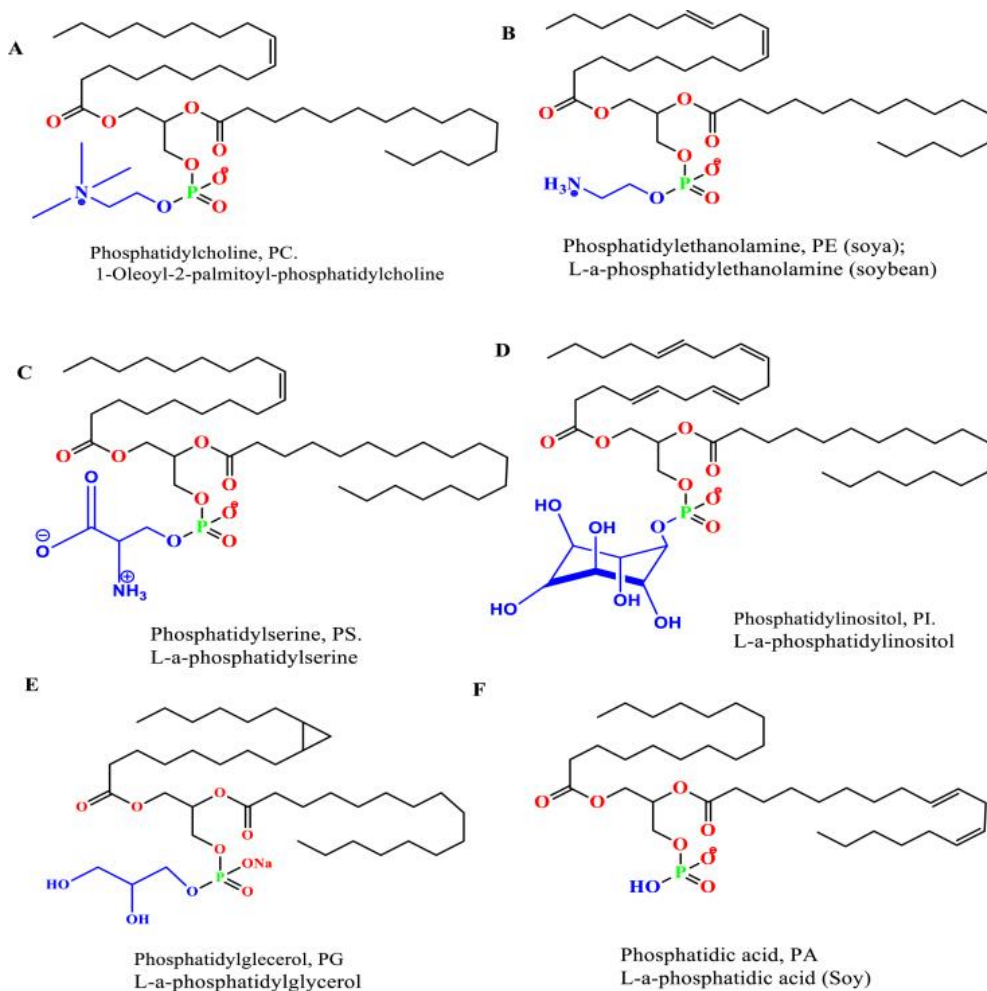


Рисунок 1.1 – Природні фосфатиди, які найчастіше використовуються для виробництва ліпосом; А) Фосфатидилхолін В) Фосфатидилетаноламін С) Фосфатидилсерин D) Фосфатидилінозит Е) Фосфатидилглицерин F) Фосфатидна кислота [2].

(гексадеканова кислота,  $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$ ); маргарова кислота (гептадеканова кислота,  $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{15}-\text{COOH}$ ), а інша є ненасиченою жирною кислотою (тут олеїнова кислота або 9Z-октадеценева кислота, яка ідентифікована в лецитині яєчного жовтка [3]). Фосфоліпіди та ПК, отримані з яєць, складаються з таких моделей жирних кислот: пальмітинова кислота (C16:0), стеаринова кислота (C18:0), олеїнова кислота (C18:1), лінолева кислота (C18:2) та арахідонова кислота (C20:4). Ці жирні кислоти становлять приблизно 92% від загального складу жирних кислот із типовою присутністю

поліненасичених жирних кислот C 20:4 (n-6) і C22:6 (n-3) у яєчних фосфоліпідах. Яєчний ПК містить близько 40% 1-пальмітоїл-2-олеїлфосфатидилхоліну. Основною насиченою кислотою була стеаринова в PE і PS і пальмітинова в інших ліпідах. Крім того, структура жирних кислот, отриманих із сої, містить близько 95% пальмітинової кислоти (C16:0), стеаринової кислоти (C18:0), олеїнової кислоти (C18:1), лінолевої кислоти (C18:2) і ліноленової кислоти (C18:3) [2].

Для розуміння хімічного складу сучасних ліпосом, можливо взяти дослідження Пен Лю і Гуйлян Чен в якому автори досліджували основні ліпосоми, які використовувалися в комерційній галузі такі, як DepoDur, Meract, DepoCyt [4].

Для формування ліпосом широко використовуються синтетичні ліпіди. Синтетичні фосфоліпіди виготовляються шляхом специфічних хімічних модифікацій неполярних і полярних областей природних фосфоліпідів. Модифікація забезпечує необмежену різноманітність чітко визначених і класифікованих фосфоліпідів [5]. Основні насичені синтетичні фосфоліпіди засновані на використанні стеаринової та/або пальмітинової жирних кислот (рис 1.2). Цифри 3 і 4 являють собою різні можливі комерційні, синтетичні та насичені фосфоліпіди, які зазвичай використовуються для приготування ліпосом [5]. Використання синтетичних ліпідів дозволяє формувати модельні мембрани з різноманітними фізико-хімічними властивостями, робити їх поведінку передбачуваною, щодо зміни навколишнього середовища: температури, рН, іонної сили розчину. Чітка визначеність фізико-хімічних характеристик модельних мембран та їх передбачувана поведінка дозволяє отримувати добре керовані ліпідні контейнери для цільової доставки біологічно активних речовин. Моделювання мембран здійснюється як за показником хімічних властивостей так і з боку їх фізичних характеристик.

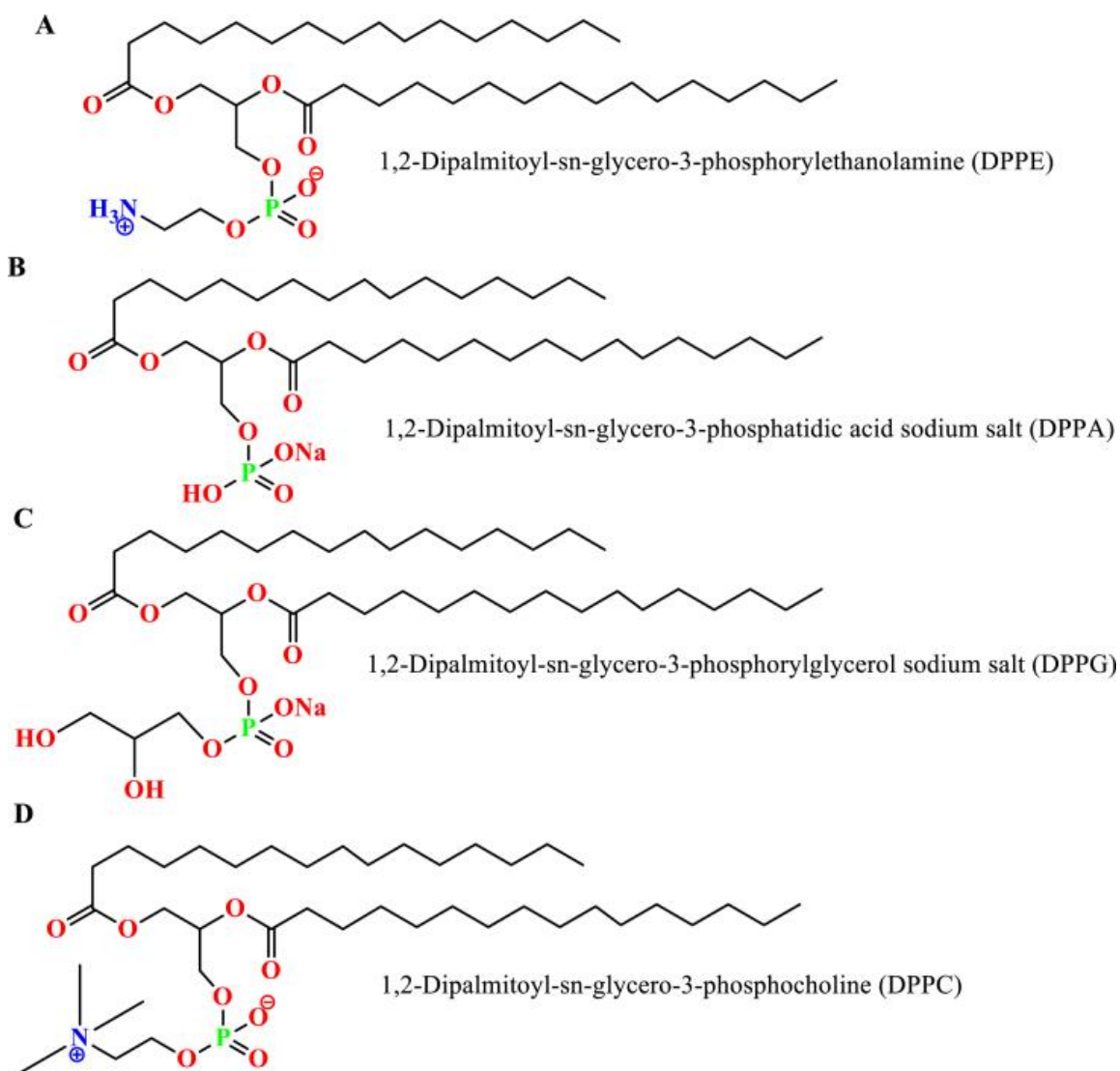


Рисунок 1.2 – Синтетичні фосfolіпіди на основі пальмітинової кислоти: А) 1,2-Діпальмітоїл-*sn*-гліцero-3-фосфорилетаноламін, Б) Натрієва сіль 1,2-Діпальмітоїл-*sn*-гліцero-3-фосфатидної кислоти, В) 1,2-Діпальмітоїл-*sn*-гліцero-3-фосфорилгліцерин натрієва сіль і Д) 1,2-дипальмітоїл-*sn*-гліцero-3-фосфохолін (DPPC) [2].

Важливо фізико-хімічною характеристикою ліпосом є дзета-потенціал, він є стандартним аналітичним вимірюванням для характеристики поверхні як природніх клітин, так і модельних везикул. Дзета-потенціал визначається як потенціал на межі гідродинамічного зсуву (тобто площині ковзання), та може давати уявлення про стабільність наночастинок, час циркуляції, взаємодію

білків, проникність частинок клітини та біосумісність. Дзета-потенціал залежить від безлічі параметрів, включаючи температуру, рН, провідність (іонну силу) і розчинник (в'язкість) [6]. Невеликі зміни в будь-якому з цих параметрів потенційно можуть мати різкий вплив на значення дзета-потенціалу.

На (рис. 1.3) зображена схема дзета-потенціалу з використанням негативно зарядженої ліпосоми в якій підкреслюється зміна потенціалу як функції відстані від поверхні наночастинки. Найбільший потенціал (в даному випадку від'ємний) знаходиться на поверхні наночастинок і називається поверхневим потенціалом. Тоді потенціал експоненціально спадає, віддаляючись від поверхні наночастинки. Безпосередньо оточує частинку шар тісно пов'язаних іонів протилежного заряду (відносно заряду поверхні наночастинки), який називається шаром Штерна [6].

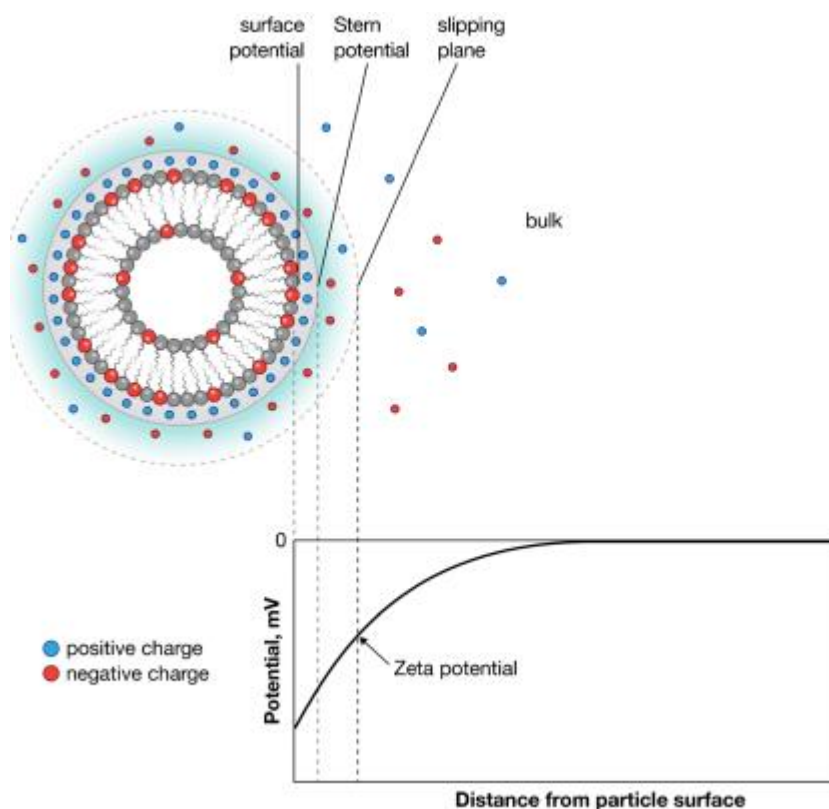


Рисунок 3 – Принципи дзета-потенціалу. Схема дзета-потенціалу [6].

Навколо шару Штерна розташований другий шар нещільно пов'язаних іонів. Точка, в якій цей другий шар іонів рухається разом з ліпосоною як єдине ціле, називається площиною ковзання. Дзета-потенціал визначається як потенціал у цій площині ковзання, що відокремлює ліпосому та пов'язані з нею іони від іонів об'ємного дисперсійного середовища під дією прикладеного електричного поля.

Потенціал у цій точці називається потенціалом Штерна і зменшується за величиною порівняно з потенціалом поверхні, як показано на графіку потенційної відстані. За шаром Штерна знаходиться другий дифузний шар слабоасоційованих іонів. Межа цього шару, відома як площина ковзання, вказує на те, де наночастинка та пов'язані з нею іони рухаються як єдине ціле. Наприклад, під дією прикладеного електричного поля іони всередині площини ковзання рухаються разом з наночастинкою, тоді як іони за межами площини ковзання (об'ємне дисперсійне середовище) ні. Потенціал у цій площині ковзання є дзета-потенціалом. Ці два шари тісно і слабо пов'язаних іонів разом називаються подвійним електричним шаром [6].

Повний електростатичний потенціал ліпідного бішару складається з трьох складових: поверхневого ( $\Psi_S$ ), трансмембранного ( $\Delta\Psi$ ) та внутрішнього дипольного ( $\Psi_D$ ) потенціалів (рис. 1.4) [7].

Поверхневий потенціал складає різницю фаз між водною фазою та поверхнею мембрани. Трансмембранний потенціал – це різниця електричних потенціалів між двома водними фазами, розділеними мембраною. Внутрішній дипольний – різниця потенціалів між поверхнею мембрани та її вуглеводневою областю та виникає за рахунок орієнтації диполів на поверхні бішару [43].

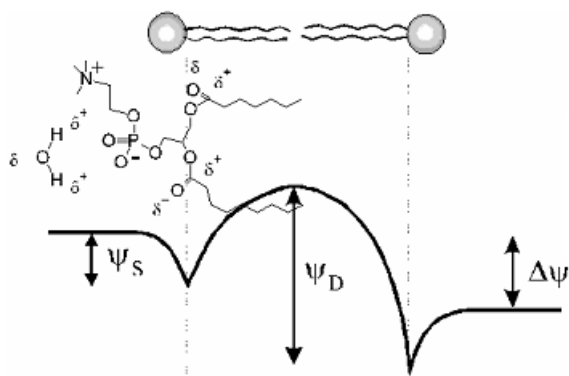


Рисунок 1.4 – Повний мембранний потенціал складається з поверхневого, трансмембранного та внутрішнього дипольного потенціалів.

Електрична провідність різних бішарів лежить у межах  $10^{-6} - 10^{-11} \text{ Ом}^{-1}\text{см}^{-1}$ , а найбільш характерне значення  $10^{-8} \text{ Ом}^{-1}\text{см}^{-1}$ . При цьому провідність не залежить від прикладеної до мембрани напруги (поки вона не досягне пробійного значення). Варіювання ліпідного складу впливає на електропровідність у разі довголанцюгових та негативно заряджених ліпідів. Додавання ж коротколанцюгових ліпідів не змінює досліджуваний параметр. Також провідність залежить від фазового стану ліпідів. При зниженні температури та переході ліпідів з рідкого в твердий стан провідність збільшується на кілька порядків. А при температурі фазового переходу в мембрані утворюються водні пори, що супроводжуються стрибками провідності до  $10^{-11} \text{ Ом}^{-1}\text{см}^{-1}$  [8].

Для мембран характерна висока міра плинності бішару, що забезпечує здатність ліпідів та білків до латеральної дифузії. Підвищена щільність упаковки (структуризація) бішару збільшує опір дифузії молекул, що транспортуються через мембрану, підвищує її в'язкість. Сама мікров'язкість визначається вмістом та співвідношенням ненасичених та насичених жирних кислот у складі ліпідів. Цей параметр зменшується зі збільшенням вмісту ненасичених жирнокислотних залишків. Також мікров'язкість зменшується зі збільшенням довжини ліпідних хвостів [9].

Проникність мембран для води складає  $\sim 31,7$  мкл/(см<sup>2</sup>с). Проникність бісла для води відіграє важливу функцію. Завдяки цій властивості мембран зміни концентрації речовин усередині та зовні клітини вирівнюються за рахунок проникнення води в клітину або виходу з неї, забезпечується рівноважний гідростатичний стан, що оберігає клітину від загибелі [9].

При невеликих концентраціях води ліпід та вода утворюють гідратований ліпід. Подальше збільшення концентрації води призводить до збільшення об'єму полярної головки, ослаблення внутрішньо- і міжмолекулярних водневих зв'язків ліпиду та утворення нових зв'язків з молекулами води, зміни конформації, і це відбувається до деякого насичення. Зазвичай із однією молекулою лецитину дві молекули води пов'язані сильно, 2 – 10 молекул – проміжний тип зв'язування, а вище цієї концентрації утворюється вже вільна вода. Максимальна кількість зв'язаної води – 205 молекул. При додаванні холестерину із ним зв'язується ще одна молекула води. А з аніонними ліпідами вода не утворює сильних взаємодій, лише слабкі, що зв'язують до 25 молекул. Між шарами знаходиться вільна вода (близько 7 молекул на молекулу ліпиду). Вона здатна розчиняти інші молекули, що потрапили в бішар. Тоді як вода, пов'язана сильними зв'язками в жодні інші взаємодії більше не вступає. Дуже сильно гідратація мембрани зростає при індукції перекисного окиснення ліпідів. Гідроперекиси, що утворюються, є гідрофільними, крім того вони роблять більш доступними для води гідрофобні структури мембрани, тим самим викликаючи її руйнування [9].

Асиметрія розподілу компонентів у біологічних мембранах обумовлена ліпід-білковими взаємодіями, асиметрією ліпідного синтезу, стеричними взаємодіями між ліпідами. Численні дослідження асиметрії біомембран дають приблизно однакові значення всім видів бішарів. Фосфатидилхолін і кардіоліпін розташовується переважно рівномірно між зовнішнім та внутрішнім шаром. У зовнішньому шарі найчастіше зустрічають

фосфатидилгліцерин, фосфатидилінозит, фосфатидилсерін, а у внутрішньому - фосфатидилетаноламін, сфінголіпіди [9].

При температурах вище за температуру фазового переходу ліпідів відбувається перехід фазового стану в бішарі типу гель-рідкий кристал. Температура переходу залежить в першу чергу від вмісту води в системі - максимальна вона при вмісті води в бішарі вище, ніж зв'язати ліпіди. У момент фазового переходу відбувається кілька подій: зростає рухливість полярних груп, збільшується оберտальна рухливість СЗ зв'язків, збільшується швидкість латеральної дифузії молекул. Внаслідок цього збільшується товщина бішару рахунок збільшення вільного обсягу кожної молекули ліпиду. Через гетерогенність мембран при фазових переходах у бішарі співіснують області вже розплавлені з більш упорядкованими. Такий фазовий поділ веде до появи різних дефектів мембран. Фазові переходи індукуються як температурою, а й рН середовища, електричним потенціалом, різними іонами, які впливають структуру ліпідів, гормонами [10].

У мембранах також є фазовий перехід, що призводить до утворення гексагональної фази НІІ. Ці структури легко утворюють коротколанцюгові ліпіди під дією температури, ненасиченості жирнокислотних ланцюгів, високої іонної сили при лужному рН, низькій гідратації. Ця фаза порушує цілісність бішару [10].

## 1.2 Особливості процесу самозбирання ліпідних контейнерів.

Ліпосоми - це маленькі штучні везикули сферичної форми, які можна створити з холестерину і природних нетоксичних фосфоліпідів. Завдяки своєму розміру, гідрофобному та гідрофільному характеру (крім біосумісності) ліпосоми є перспективними системами доставки ліків.

Властивості ліпосом значно відрізняються залежно від ліпідного складу, поверхневого заряду, розміру та способу отримання. Крім того, вибір компонентів подвійного шару визначає «жорсткість» або «текучість» і заряд подвійного шару. Наприклад, ненасичені види фосфатидилхоліну з природних джерел (яєчний або соєвий фосфатидилхолін) дають набагато більш проникні та менш стабільні подвійні шари, тоді як насичені фосфоліпіди з довгими ацильними ланцюгами (наприклад, дипальмітоїлфосфатидилхолін) утворюють жорстку, досить непроникну двошарову структуру [11].

Протягом багатьох років були розроблені та оптимізовані різні рецепти приготування ліпосом у лабораторному масштабі. Технології приготування ліпосом можна розділити на (а) масові методи, де ліпосоми отримують шляхом перенесення фосфоліпідів із органічної фази у водну фазу та (б) плівкові методи, за яких ліпідні плівки спочатку наносять на підкладку, а потім гідратують з утворенням ліпосом. Методи підготовки також були класифіковані на основі середнього розміру, полідисперсності та пластинчастості отриманих ліпосом, оскільки контроль над цими параметрами залишається проблемою майже для всіх методів підготовки. Для застосувань доставки біологічно активних речовин бажаний розмір ліпосом коливається від 50 до 200 нм.

Фосфоліпіди мають гідрофільну головну групу та два довгі гідрофобні хвости, що робить їх погано розчинними у воді, якщо вони не збираються самостійно у подвійні шари. Кінцева ділянка фосфоліпідного бішару має енергію, пов'язану з його краєм, де гідрофобні хвости піддаються впливу води, і пропорційна периметру ділянки (рис. 1.4А). Ця енергія може бути зведена до мінімуму шляхом усунення краю, якщо двошарова ділянка закривається, утворюючи сферичну везикулу. Однак існує також енергетичний штраф, пов'язаний із згинанням подвійного шару в сферу, яка є пропорційною до квадрата радіуса сфери [12]. Коли подвійний шар перебудовується з плоского диска в сферу, загальна енергія системи спочатку збільшується за рахунок

енергії вигину подвійного шару. Згодом загальна енергія зменшується, коли краї зустрічаються та зникають. Під час процесу згинання бішару в сферичну везикулу (рис. 1.4А), пластир може збільшуватися в розмірах через додавання молекул фосфоліпідів та інших двошарових фрагментів. Також можливо, що гідродинамічні та інші дестабілізуючі сили можуть призвести до фрагментації бішару, що може призвести до утворення менших ліпосом. Молекули фосфоліпідів самозбираються в стопку подвійних шарів на підкладці, коли органічний розчинник видаляється шляхом випаровування (Lasic, 1993) [12]. Під час гідратації двошарові стопки відокремлюються дуже повільно, і якщо краям двошарового шару дозволити зливатися з більшою швидкістю, утворюються багатошарові везикули (MLV) (рис. 1.4Б). Збільшення швидкості поділу бішару шляхом застосування електричних полів або зменшення швидкості злиття бішару шляхом придушення [12].

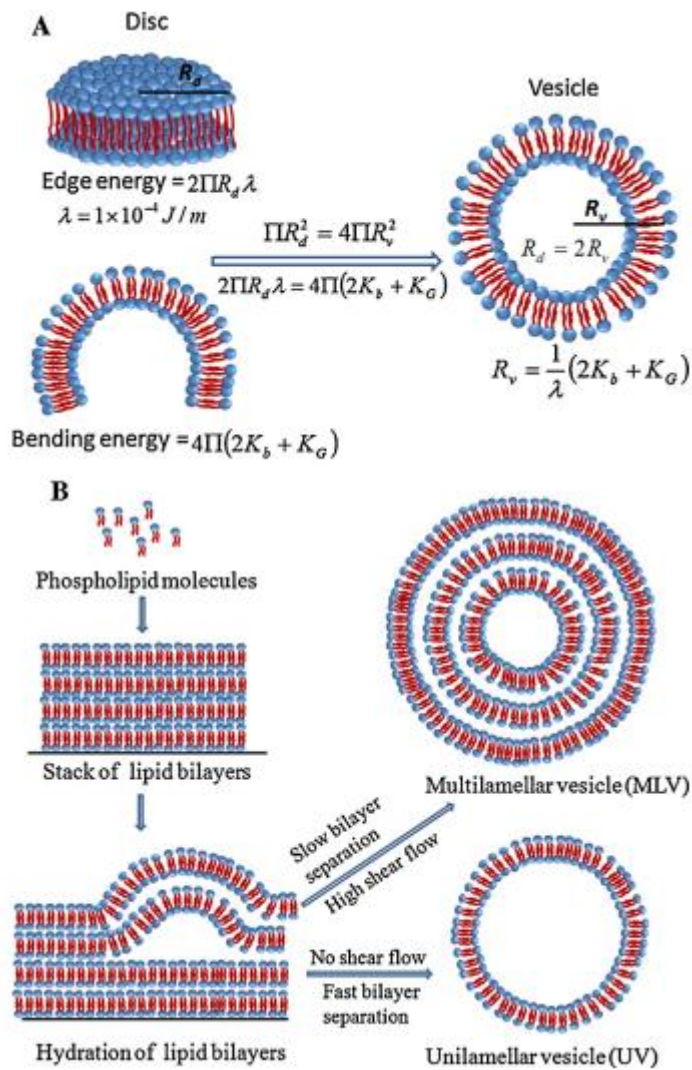


Рисунок 1.4 – Схема, що ілюструє самозбірку фосфоліпідів, що беруть участь у формуванні ліпосом. Найменша ліпосома утворюється, коли енергія краю спочатку перевищує енергію вигину [12] (А). Відносна кінетика двошарового згортання внаслідок гідродинамічних сил і розділення двошарового шару під дією сил гідратації диктує розмір і ламелярність творених везикул (Б). Принципова діаграма не в масштабі.

Розмір ліпосом може варіюватися від дуже маленьких (0,025 мкм) до великих (2,5 мкм) везикул. Крім того, ліпосоми можуть мати одну або двошарову мембрану, як зазначено на (рис. 1.4) Розмір везикул є важливим

параметром у визначенні періоду напіврозпаду ліпосом, і як розмір, так і кількість подвійних шарів впливають на ступінь інкапсуляції біологічно активних речовин у ліпосомах. Ліпосоми можна класифікувати як одношарові везикули (ULV), оліголамелярні везикули (OLV), багатошарові везикули (MLV) і мультивезикулярні ліпосоми (MVL) залежно від компартментної структури та ламелярності (рис. 1.5) [11]. OLV та MLV мають аноніонну структуру, але містять 2–5 та >5 концентричних ліпідних подвійних шарів відповідно. На відміну від MLVs, MVLs включають сотні неконцентричних водянистих камер, обмежених однією двошаровою ліпідною мембраною та мають стільникову структуру. Залежно від розміру частинок ULV можна додатково розділити на малі одношарові везикули (SUVs, 30–100 нм), великі одношарові везикули (LUV, >100 нм) і гігантські одношарові везикули (GUV, >1000 нм). Повідомлялося про різний діапазон розмірів ULV, тобто SUV з розміром менше 200 нм і LUV з розміром 200–500 нм.

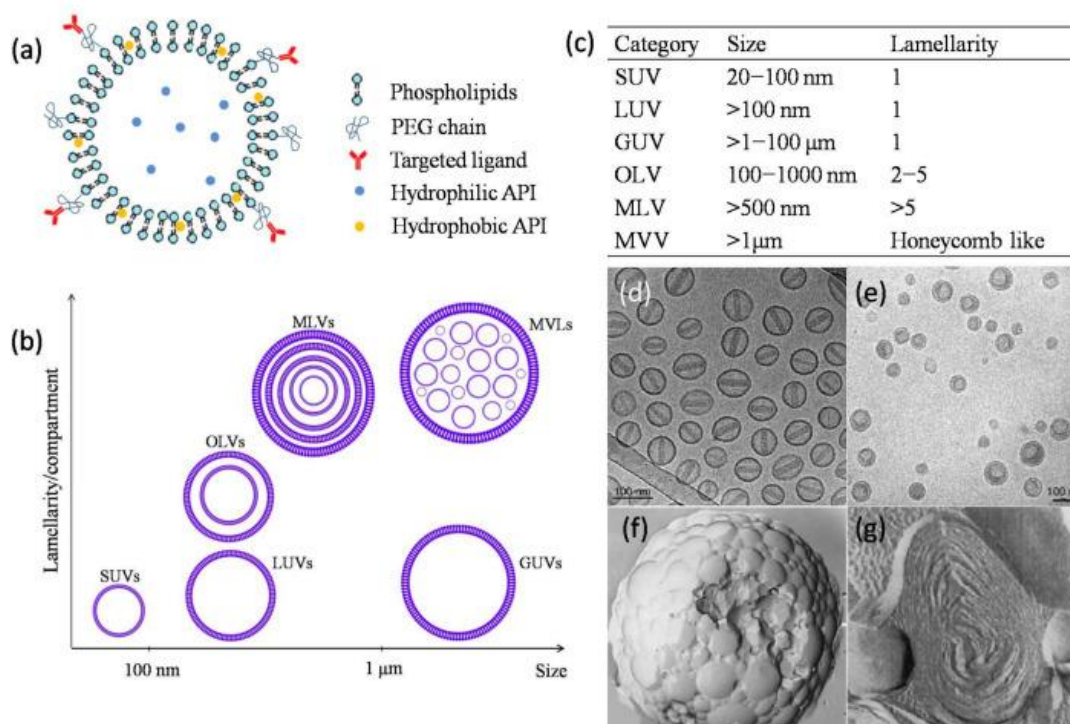


Рисунок 1.5 – Категорії та структури ліпосомальної системи доставки ліків.

(a) Структурна ілюстрація складу ліпосом. Розмір типового фосфоліпідного

подвійного шару становить 4,5 нм, що набагато менше, ніж у внутрішнього водного ядра; **(b)** Класифікація ліпосомальних везикул відповідно до їх пластинчастості/компарменту та розміру частинок; **(c)** Розмір і пластинчастість різних типів ліпосом; **(d,e)** кріотрансмісійна електронна мікроскопія Dohil і Vuxeos; **(f,g)** Електронні мікрофотографії частинки з типовим діаметром 1-100 мкм (наприклад, DepoCyt) і MLVs з типовим діаметром 0,2-5 мкм [28]. «Рисунок 1.5, аркуш 18»

Також у своїй статті Пен Лю і Гуйлян Чен зазначають, що на даний момент вже є чотири ліпосомальні контейнери з мікронним діаметром, які використовують у комерційних цілях, тобто Meract, DepoCyt (суспензія ліпосом цитарабіну), DepoDur (суспензія ліпосом із пролонгованим вивільненням морфіну для ін'єкцій) і Exparel (суспензія ліпосом із бупівакаїном для ін'єкцій).

Більшість поточних комерційних продуктів є SUVs (наприклад, Dohil (рис. 1.5d) через тривалий час циркуляції та здатність пасивно націлюватися на таргетні клітини Agikaue (суспензія для інгаляції ліпосом амікацину) вважається LUV через великий розмір частинок (200–300 нм). Vuxeos (даунорубіцин: ліпосома цитарабіну для ін'єкцій) є двомелярною ліпосомною системою (рис. 1.5e), яка утворюється під час першої процедури завантаження цитарабіну. Механізм утворення внутрішньої пластинки пояснюється термодинамічною реакцією ліпідного подвійного шару на зменшення співвідношення площі поверхні до об'єму ліпосом, викликаного виходом води у відповідь на зовнішній осмотичний виклик. Muoset (ліпосомальний доксорубіцин) і Meract (ліпосомальний міфамуртид порошок для концентрату для дисперсії для інфузій) (рис. 1.5g) є MLV. Численні ламели забезпечують великий простір для інкапсуляції ліпофільних сполук.

Meract є стерильним ліофілізованим осадом і утворює багат шарові ліпосоми з розміром частинок 2,0–3,5 мкм після відновлення 0,9% сольовим

розчином. Цей розмір є ідеальним для розпізнавання та фагоцитозу моноцитами/микрофагами, а також запускає макрофаги та імуномодулюючий ефект для терапії раку. Структура MVL зображена на (рис. 1.5f) може завантажувати великий об'єм лікарсько-водного розчину завдяки численним камерам і забезпечувати тривале вивільнення через ерозію/деградацію ліпосом і дифузію молекул активних речовин.

На даний час є 2 традиційних методи формування гігантських везикул.

Гідратації фосфоліпідної плівки. Процес синтезу передбачає осадження фосфоліпідів, з розчину в органічному розчиннику наприклад, хлороформ або етанол, на субстрат. Плівка, що складається з складених фосфоліпідних подвійних шарів, згодом гідратується протягом кількох днів за відсутності гідродинамічного потоку, щоб отримати водну суспензію GUV. Хоча значна частина популяції везикул також складається з MLV, метод м'якої гідратації (також відомий як метод «природного набухання») є кращим для отримання GUV заряджених фосфоліпідів.

Електроформування. У цьому методі фосфоліпідна плівка осідає на електродах і згодом гідратується протягом кількох годин у присутності електричного поля. Хоча GUV утворюються шляхом застосування як змінного, так і постійного струму, поля постійного струму не є кращими, оскільки вони призводять до утворення бульбашок через електроліз води. З результатів досліджень зазначалось, що 80% популяції електроформованих везикул є одношаровими і не мають дефектів [12].

Для формування багатошарових ліпосом використовують гідратацію фосфоліпідної плівки під дією гідродинамічного потоку. MLV утворюються, коли суха фосфоліпідна плівка зі складених подвійних шарів, нанесена на підкладку, повторно гідратується під сильними гідродинамічними потоками протягом кількох годин [5]. Отримана суспензія MLV містить везикули, неоднорідні за розміром і пластинчастістю.

До традиційних методів отримання малих і великих одношарових везикул (SUV і LUV) відносять обернено-фазове випаровування та введення органічного розчинника з розчиненими фосфоліпідами у водну фазу.

Обернено-фазове випаровування. Подібно до методу кульок розчинника, який використовується для приготування MLV, зворотне фазове випаровування також включає гідратацію фосфоліпідів, розчинених в органічній фазі, шляхом додавання води з інтенсивним перемішуванням. На відміну від методу кульок розчинника, у цьому випадку утворюється емульсія вода в маслі, а випаровування органічної фази призводить до утворення водної суспензії, що містить LUV, а також MLV. Нижчі концентрації фосфоліпідів у водній суспензії дають більшу частку LUV порівняно з MLV.

Введення органічного розчинника з розчиненими фосфоліпідами у водну фазу. При введенні у водний буфер органічного розчинника (етанолу або ефіру), що містить розчинені фосфоліпіди, спостерігається спонтанне утворення SUV [12]. Коли етанол вводять, він розчиняється у воді, а розведення етанолу нижче критичної концентрації змушує розчинені фосфоліпіди самозбиратися у водній фазі та утворювати SUV. Навпаки, при введенні ефірного розчину фосфоліпідів у воду утворення SUV є результатом випаровування ефіру.

## 2 МОДИФІКАЦІЯ ФІЗИЧНОГО СТАНУ МОДЕЛЬНИХ ЛІПІДНИХ МЕМБРАН

### 2.1 Вплив температури та рН середовища на ліпосомальні контейнери

Для поліпшення контролю захоплення потрібної активної речовини, мембрану можливо модифікувати холестерином та маніпулювати складом мембрани ліпосомальних контейнерів. Окрім цього слід зазначити, що температура та рН суттєво можуть вплинути на їх подальшу поведінку.

Чжанта та ін. повідомили, що рН і температура впливають на ступінь гідролізу фосфоліпідів і, таким чином, на термін зберігання ліпосом [13]. Так само Сулковський та ін. встановили, що текучість мембрани зростає з підвищенням рН і температури; протонування фосфоліпідів відбувається при нижчих значеннях рН, що призводить до сприятливого водневого зв'язку та підвищення температури фазового переходу [14]. При підвищеній температурі асоціативна взаємодія між молекулами фосфоліпідів стає менш імовірною, що призводить до псевдозрідження мембрани. Підвищення температури ліпосомної системи знижує стабільність агрегатів ліки-ліпосоми. Зі збільшенням температури упаковка вуглеводневого ланцюга двошару стає випадковою, тим самим зменшуючи жорсткість мембрани через пориподібні дефекти та утворення двошарового диска. Це зрештою знижує стабільність молекулярного зонда або препарату, включеного в ліпосому.

У своєму дослідженні Дж. Х. Кім і MW Кім вивчали температурний вплив на пасивний транспорт органічних катіонів через аніонні бішари ліпосом, виготовлені з ненасичених і насичених ліпідів, використовуючи поверхнево-специфічний метод, відомий як оптична генерація другої гармоніки (SHG) [15]. Акценти в дослідженні ставили на вплив рН, складу та температури на фізико-хімічну поведінку чотирьох різних біоміметичних

мембран (SPC, DPPC, DPPG і DPPC +DPPG). В результаті дослідження виявлено, що на автокореляційні криві не впливає рН і ліпідний склад, що вказує на стабільність ліпосом щодо рН і ліпідного складу [15]. Водночас слід зазначити, що SPC і DPPC розміри ліпосом, як правило, збільшуються зі збільшенням рН середовища, протилежна тенденція спостерігалася для негативно заряджених DPPG, ліпосом DPPC+DPPG. При пониженні рН фосфатні групи ліпідів, які були протоновані, з'єднувалися водневими зв'язками з сусідніми молекулами фосфоліпідів. Ліпосоми DPPC+DPPG демонстрували найбільші розміри при кислому рН. Це сталося через домінування водневих зв'язків над силами відштовхування між фосфоліпідами в присутності DPPG. Однак при нейтральному та лужному рН сили відштовхування між молекулами DPPG стали переважати, зменшуючи розміри відповідних ліпосом.

При обробці ліпосом температурою в діапазоні 25–50°C. Усі ліпосоми демонстрували звуження розміру при  $\sim 40^\circ\text{C}$ , як під час циклів нагрівання, так і під час охолодження, які відповідають температурі плавлення ланцюга двослою фосфоліпиду. Бішари фосфоліпідів зазнають зміни з високовпорядкованої гелевої фази на рідку фазу, що призводить до звуження розміру. Передбачається, що через плавлення ланцюга взаємна змішуваність між ліпідними компонентами збільшиться, тим самим зменшуючи дефекти упаковки.

Та ж група проводила дослідження по захопленню куркуміна ліпосомами (SPC, DPPC, DPPG і DPPC +DPPG) та подальшого його вивільнення під впливом різних рН та температури [14]. Результати показали відносну стабільність концентрації речовини в ліпосомах при підвищенні температури та спроможність утримувати куркумін протягом 20 годин при рН 7,4, яке є середньою величиною для крові людини. Тобто подібні ліпосомальні контейнери можуть повною мірою доносити активні речовини подібні до куркуміна до клітин/органів мішеней.

## 2.2 Модифікація ліпосомальних контейнерів молекулами холестерину

Однією з основних ролей холестерину в еукаріотичних клітинах є модуляція фізичних властивостей фосфоліпідного подвійного шару плазматичної мембрани. Включення холестерину, як в модельну, так і в інтактну мембрану викликає різноманітні зміни у властивостях подвійного шару. Наприклад, це зменшує площу молекулярної поверхні і проникність мембрани, змінює швидкість латеральної дифузії як для білків, так і для ліпідів, розширює фазовий перехід гелю до рідкокристалічного стану.

Молекулярна структура холестерину включає тетрациклічний злитий кільцевий скелет з однією гідроксильною групою при вуглеці 3, подвійним зв'язком між вуглецьми 5 і 6 і ізооктильним вуглеводневим бічним ланцюгом при вуглеці 17, зображеного на рис. 2.1.

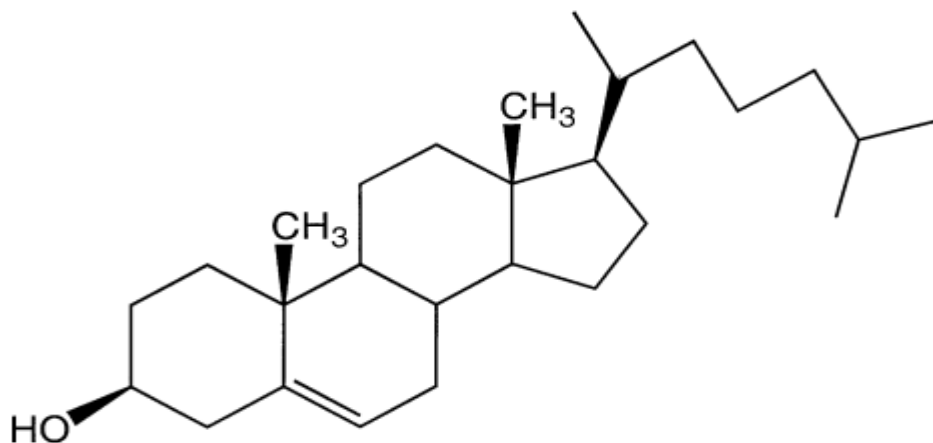


Рисунок 2.1 – Хімічна структура 5-холестена-3β -ол або холестерин

Гідроксильна група в холестерині дуже важлива, оскільки вона надає гідрофобній сполуці її амфіфільний характер і, отже, орієнтує молекулу в мембранах. Можливо зазначити, що найбільш привабливою функцією холестерину для використання його як модифікатор ліпосомальних

контейнерів є, можливо, його здатність модулювати фізико-хімічні властивості клітинних мембран. При встроюванні його до фосфоліпідних ліпсомальних контейнерів, холестерин орієнтується у фосфоліпідному подвійному шарі, причому його полярна гідроксильна група стикається з водною фазою, а гідрофобне стероїдне кільце орієнтоване паралельно вуглеводневим ланцюгам фосфоліпідів і заховане в них. У мембрані холестерин взаємодіє з мембранними фосфоліпідами та сфінголіпідами та впливає на їх поведінку. Включення зростаючих рівнів холестерину розширює та зрештою повністю усуває кооперативний фазовий перехід гель/рідина-кристал ліпідного подвійного шару господаря [16]. Холестерин індукує «проміжний стан» у молекулах фосфоліпідів, з якими він взаємодіє, підвищуючи плинність вуглеводневих ланцюгів нижче та зменшуючи плинність над  $T_m$  (температура фазового переходу) [16].

Як зазначалося раніше холестерин приймає участь у формуванні більшості як комерційних так і досліджувальних модельних мембран. Включення холестерину як в модельну, так і в інтактну мембрани викликає різноманітні зміни у властивостях подвійного шару [17]. Наприклад, це зменшує молекулярну поверхню і проникність мембрани, змінює швидкість латеральної дифузії як для білків, так і для ліпідів, розширює фазовий перехід гелю до рідкокристалічного та пом'якшує порядок ацильного ланцюга як у гелевій, так і в рідкокристалічній фазах.

В своєму дослідженні Saptarshi Chakraborty, Milka Doktorova встановлювали вплив концентрації холестерину в ліпідному біслої на жорсткість модельної мембрани ліпосомальних контейнерів [18]. Експеримент проводився над DOPC-Chol модельною мембраною з концентрацією (0, 10, 20 і 40) мол.% Chol. Аналіз різних структурних параметрів із моделювання показав, що середня площа на молекулу постійно зменшувалася від  $\sim 68 \text{ \AA}^2$  при 0 мол.% Chol до  $\sim 44 \text{ \AA}^2$ , коли показник холестерину наближався до 50 мол.% Chol [18].

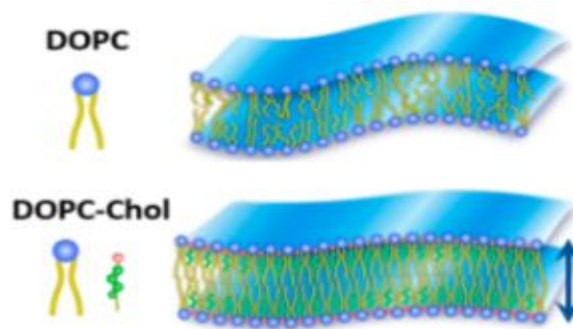


Рисунок 2.2 – Модельна мембрана на основі DOPC та DOPC-Chol [18].

Як видно, рис. 2.2 ілюструє як відбувається структурний вплив Chol на мембрани DOPC, тобто в результаті вбудовування холестерину відбувається збільшення товщини мембрани та ущільнення ліпідів. Автори в результаті декількох досліджень прийшли до висновку, що жорсткість насичених ліпідів модельної мембрани починає збільшуватися пропорційно до концентрації холестерину, це відбувається за рахунок того, що при вбудовуванні у ліпідний бішар холестерол збільшую щільність упаковки ліпідів та товщини подвійного шару [18]. Проте дослідження ненасичених ліпідів, таких як DOPC, показали напрочуд різні тенденції. Незважаючи на докази того, що Chol виявляє схожі структурні ефекти на ненасичені ліпідні мембрани, повідомлялося, що він не впливає на жорсткість мембрани при вигині.

У своєму дослідженні S. Bhattacharya, S. Halder порівнювали ефект включення холестерину в ліпосоми сформовані на основі двох катіонних ліпідів (DODAB і DOETAB), що позбавили будь-якої функціональної групи в зв'язках з ліпідним каркасом і вуглеводневими ланцюгами [19]. Параметри термічного фазового переходу ліпідів та їх мембран, легованих холестерином, визначали за допомогою флуоресцентних спектроскопічних досліджень. Отриманні результати показали, що включення холестерину в мембрани, що сконструйовані з природного фосфоліпиду (DPPC) знижує жорсткість отриманих подвійних шарів нижче  $T_m$ , що іншими словами свідчить про те,

що мембрани стають більш гнучкими нижче  $T_m$  [19]. Окрім цього в ліпідах, які не містять складнофірного типу вуглеводневого ланцюга-основної з'єднувальної функції, анізотропія, збільшувалася зі збільшенням мол.% холестерину в гелевій фазі мембранної матриці. Таким чином, для чистих катіонних ліпідних мембран початкові значення  $r$  є значно нижчими, ніж у бішарах DPPC. Холестерин зменшує відштовхування головних груп ліпідів між мономерами в цих катіонних ліпідних угрупованнях [19].

Ця ж група вчених в процесі своїх подальших досліджень прийшла до висновку, що в разі використання катіонних ліпідів, коли відштовхування головних груп є високим, включення холестерину збільшує відстань між головними групами та стабілізує отримані двошарові мембрани. Гідрофобна стабілізація змішаного подвійного шару потім посилюється за допомогою гасіння руху ланцюга включенням молекули холестерину [19].

### 3 ЛІПОПРОТЕІНОВІ КОМПЛЕКСИ ЯК ФАКТОР МОДИФІКАЦІЇ МОДЕЛЬНИХ МЕМБРАН

#### 3.1 Взаємодія пептидів з ліпосомальними контейнерами

Результатом взаємодії ліпосом з пептидами можуть бути утворення пор в двошарових мембранах. При цьому такі пептиди, як HA-2 N-кінцевий пептид, GALA та інші, використовувалися для перенесення генів, головним чином для сприяння вивільненню ДНК з ендосом [20]. Химерний пептид, отриманий з гідрофобного злитого пептиду gp41 ВІЛ-1 і гідрофільної послідовності ядерної локалізації великого Т-антигену SV40 досліджувався як потенційний засіб доставки нуклеїнових кислот у культивовані клітини [20]. Витік може відбуватися за рахунок того, що пептиди не розподіляються між везикулами [20]. Процес можливо розглянути на прикладі пептиду GALA та HIV. Витік з ліпосом внаслідок утворення пор пептидами, які не перерозподіляються між везикулами, характеризується наступними ефектами: 1 – ступінь витоку збільшується з часом, доки не досягне остаточного рівня, який залежить від співвідношення ліпід/пептид; 2 – витік вмісту везикул відбувається за механізмом «все або нічого», тобто деякі з везикул вивільняють увесь свій вміст, тоді як інші зберігають увесь свій вміст; 3 – витік залежить від розміру інкапсульованих молекул [20]. В разі моделювання процесу взаємодії можливо припустити, що після швидкої стадії зв'язування пептиду з мембранами везикул відбувається поверхнева агрегація пептиду [31]. Коли структура та конформація використовуваних пептидів є відповідними, агрегати, які досягли критичного розміру, тобто включають M або більше пептидів, утворюють пори. Якщо поверхнева агрегація пептиду є незворотною, тоді везикули, які містять M або більше зв'язаних пептидів,

зрештою випустять увесь інкапсульований вміст, тоді як інші везикули не витікають взагалі. Кінетика витоку забезпечується кінетикою поверхневої агрегації, оскільки після утворення пори витік усього вмісту відбувається менш ніж за 1 с. в такий спосіб, досягаючи кінцевого об'єму. За таких умов, коли поверхнева агрегація є зворотною, лише частина везикул, що містить понад  $M$  пептидів, утворює пори  $i$ , як наслідок, витікає весь їхній вміст.

В одному з досліджень взаємодії пептидів з ліпідною мембраною автори запропонували модель пороутворення, в якій припускають, що 1 - пептиди зв'язуються та вбудовуються в бішар везикул, 2 – агрегація пептидів відбувається всередині мембран (див. рис. 3.1) [20]. Коли агрегат усередині мембрани досягає критичного розміру, тобто складається з  $M$  пептидів, канал або пори можуть бути створені всередині мембрани, і може статися витік інкапсульованих молекул. Розмір пори визначає верхню межу розміру (і форми) молекул, які можуть витікати. Розмір пори залежить від кількості пептидів, що її утворюють. Передбачається, що процес включення пептиду в мембрану везикул є швидким і, як тільки у везикулі утворюється пора, весь її вміст витікає досить швидко.

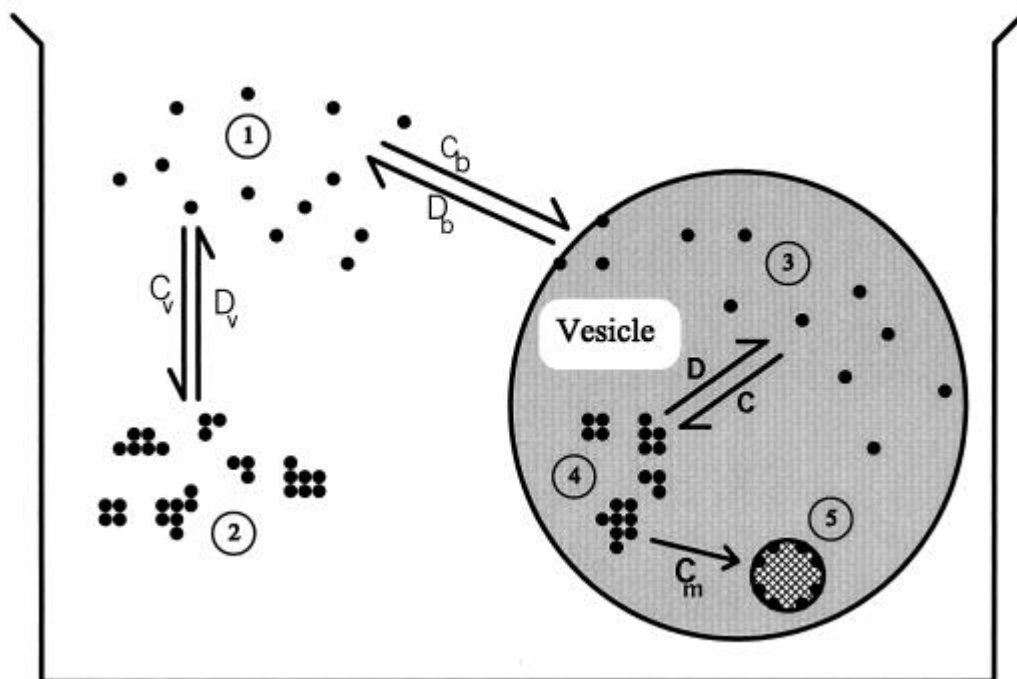


Рисунок 3.1 – Схематична модель процесу, пов’язаного з утворенням пор пептидами: 1 – вільні пептиди в розчині; 2 – пептидні агрегати в розчині; 3 – зв’язані пептиди в мономерній формі; 4 – агрегати зв’язаного пептиду; 5 – пори, створені агрегатом зв’язаних пептидів.  $C_b$  і  $D_b$  – швидкості зв’язування і дисоціації пептидів з мембранами, відповідно.  $C_v$  і  $D_v$  — швидкість агрегації та дезагрегації пептидів у розчині, відповідно  $C$  — швидкість агрегації зв’язаного пептиду в мембрані, а  $D$  — швидкість дезагрегації в мембрані.  $C_m$  – швидкість морфологічної зміни пептидних агрегатів до пор.

Таким чином, передбачається, що швидкість витоку обмежена швидкістю утворення агрегатів, що складаються з  $M$  або більше пептидів у мембрані. До цієї стадії фактичний перехід від агрегату до пори (рис. 3.1) неявно вважався швидким, але цей момент можна дослідити далі.

Автори в результаті дослідження прийшли до висновку, що для постійної кількості ліпідів і заданого співвідношення ліпідів/пептидів ступінь витоку має зменшуватися зі зменшенням діаметра везикул [20]. Це пов’язано з тим фактом, що коли розподіл розмірів везикул зміщується в бік менших

везикул, буде менша кількість зв'язаних пептидів на ліпосому. Щоб перевірити це, окремий препарат везикули фракціонували на популяції різного розміру шляхом послідовної екструзії через 0,2-, 0,1- і 0,05-мм полікарбонатних мембран [20]. Окрім цього слід також зазначити вплив концентрації холестерину в модельних мембранах POPC/POPG, при включенні холестерину до мембрани ліпосом, ефективність індукції витоку пептидом знижувалась. Автори припускають, що частково цей ефект пояснюється зниженням зв'язуванням та оберненістю поверхневої агрегації пептиду [20].

### 3.2 Використання пептидів для таргетної доставки активних речовин ліпосомальними контейнерами

В результатів досліджень було продемонстровано, що на вивільнення лікарського засобу з ліпосом впливає склад ліпосомальної мембрани та фізико-хімічні властивості інкапсульованого препарату [21]. Однією з проблем в використанні ліпосом полягає в тому, що стандартні ліпосоми (немодернізовані) доволі швидко виводилися з кровообігу або поглиналися макрофагами. Відповідно, було зроблено багато спроб посилити їх фармакокінетичні характеристики після системного введення. Спочатку було встановлено, що зміна фізико-хімічних властивостей ліпосом, таких як розмір, текучість, чистий поверхневий заряд і упаковка ліпідних подвійних шарів, впливає не тільки на фізичну стабільність ліпосом, але й на їх поглинання клітинами MPS(система мононуклеарних фагоцитів). Зазначається, що заряджені ліпосоми та/або ліпосоми великого розміру виводяться із системного кровообігу швидше, ніж нейтральні та/або ліпосоми малого розміру. Крім того, використання насичених фосфоліпідів або включення

холестерину, що збільшує упаковку фосфоліпідів у ліпідному подвійному шарі, зменшує поглинання ліпосом клітинами.

Крім того, контрольоване вивільнення можна досягти за допомогою хімічно модифікованих ліпідних компонентів, які реагують на внутрішні або зовнішні подразники. Здатність таких інтелектуальних ЛП вивільняти активні речовини контрольованим способом базується на різних фізіологічно залежних властивостях, які підвищують точність визначення часу та місця вивільнення корисного навантаження та забезпечують кращий контроль над доставкою активних речовин.

Можливо впевнено стверджувати, що завантаження активної речовини в ліпосомі дозволяє селективну доставку адекватних концентрацій захопленої біологічно активної речовини до місця дії. Захоплена ліпосомами речовина, не є біодоступною, доки не буде вивільненою. Тому оптимізація швидкості вивільнення корисного ліпосомального навантаження вважається вирішальним чинником загальної терапевтичної ефективності ліпосомальних систем. За рахунок них можливо забезпечити доставку адекватної концентрації активної речовини з належною швидкістю до цільової ділянки. Для протидії процесу поглинання ліпосом фагоцитами було вирішено підвищити фармакокінетику ліпосом через встроювання в поверхню ліпосом інертних, біосумісних гідрофільних полімерів, такими як гангліозид GM1, осфатидилінозит або ліпідкон'югованого поліетиленгліколю (ПЕГ) рис. 3.2. Ці полімери утворюють гідрофільний захисний шар, уповільнюючи системний кліренс ліпосом и тим самим збільшуючи час циркуляції та можливість ліпосом накопичуватися в цільовій тканині. Пасивне націлювання якісно використовують в лікуванні солідних пухлик, де негерметичність судинної мережі пухлини викликає переважне накопичення ліпосом у тканині пухлини [22].

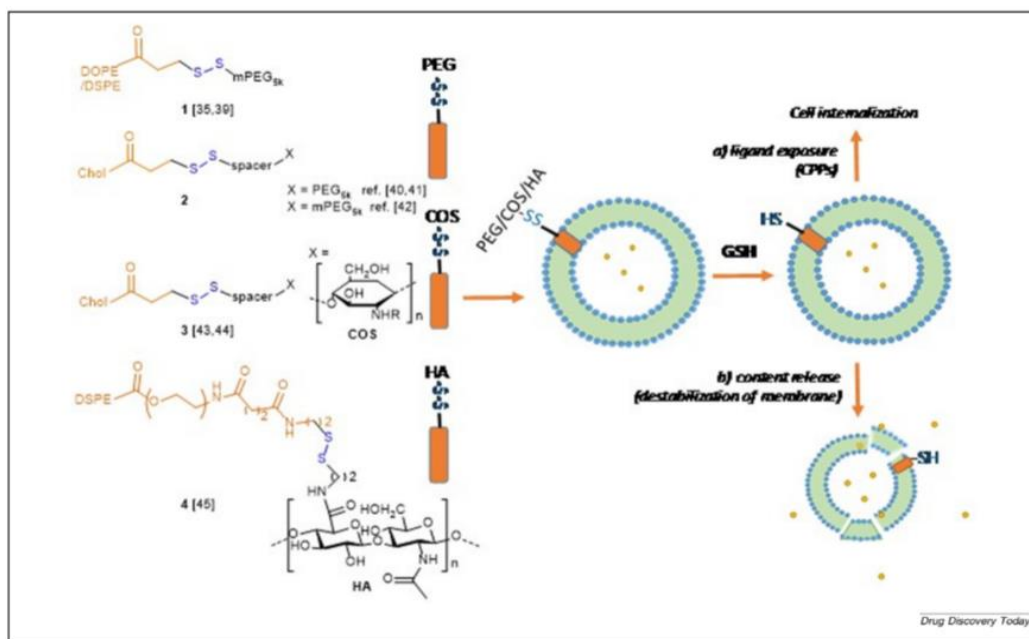


Рисунок 3.2 – Окисно-відновні хімічні структури 1–4 бере участь у опосередкованому глутатіоном (GSH) декрануванні ЛП. Хол, холестерин; COS, хітоолігосахариди; CPP, клітинний пептид; DOPE, 1,2-діолеіл-sn-гліцero-3-фосфоетаноламін; DSPE, 1,2-дистеарoїл-sn-гліцero-3-фосфорилетаноламін; ГК, гіалуринона кислота; mPEG, метокси поліетиленгліколь; PEG, поліетиленгліколь; SS, дисульфідний міст [22].

Було розроблено декілька хімічних стратегій для контролю окисно-відновних ЛП, більшість з яких базується на 1) використанні дисульфідних зв'язків для зв'язування фосфоліпідів, холестерину (Chol) і ліпідоподібних структур, і 2) зовнішньої гідрофільної частини (рис. 3.3) [23]. Розщеплення дисульфідного зв'язку може порушити ЛП, викликаючи викид корисного навантаження у внутрішньоклітинне середовище. Автори дослідження пропонують окисно-відновні модифікації бішарів ЛП [23]. За рахунок цього підходу можливо доволі просто сформувати ПЕГільовані ЛП в результаті утворення дисульфідного зв'язку.

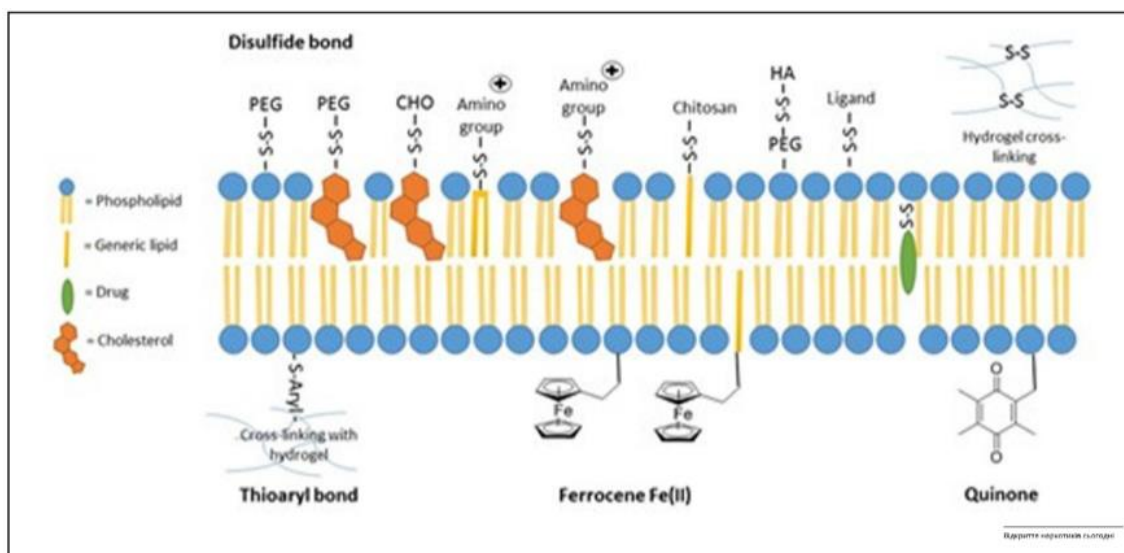


Рисунок 3.3 – Схематичне зображення основних хімічних стратегій, що використовуються для розробки окисно-відновних ЛП [23].

Як було зазначено раніше ліпосомальні контейнери дуже гарно зарекомендували себе, як специфічні переносники біологічно активних речовин. Така здатність ліпосом стала справжнім надбанням для боротьби з раковими захворюваннями. До їх появи, велика токсичність, низька стабільність *in vivo* та мала специфічність пептидних активних речовин, давала відносно невелику дію на таргетні клітини, через інкапсулювання макрофогома з подальшим вивільненням з кровообігу або взаємодією з нетаргетними клітинами, спричиняючи пошкодження здоровим клітиним.

Однією з головних проблем щодо доставки пептидних біологічно активних речовин є їх стабільність *in vivo*. Пептиди ферментативно розщеплюються різними ферментами протеазами разом з іншими ферментами, знижуючи їх біодоступність. Захист пептидів і білків у шлунково-кишковому тракті може бути досягнутий певною мірою за допомогою двошарової системи доставки ліків на основі ліпідів [24]. Інкапсуляція в ліпосомальний подвійний шар білків і пептидів може запобігти їх деградації. У ліпосомах, функціоналізованих пептидами, пегілювання поверхні ліпосом допомагає захистити приєднаний націлюючий пептид від

деградації. Ліпосоми також можуть зменшити токсичність інкапсульованого препарату, доставляючи активну речовину до конкретного цільового місця.

За допомогою кон'югації пептидів з ліпосомальною системою стала однією з основних частин техніки доставки активних речовин під час терапії раку. Ця процедура допомагає розробити націлену ліпосомальну систему з тим, що функція націлювання пептиду зберігається завдяки його прикріпленню до зовнішнього шару ліпосом, схематичний принцип роботи пептидів зображено на (рис. 3.4). Як зазначається більшість пептидів мають структурну та біологічну функціональність, щоб надавати націлюючий ефект на місце пухлини [25]. Пептидно-функціоналізовані ліпосомальні препарати, про які повідомляється в літературі, націлені на велику кількість селективних рецепторів, які зазвичай надмірно експресуються на раковій клітині, тканині або судинній системі раку. Ці пептидні мішені можна розділити на три різні категорії, такі як рецептори, пов'язані з G-білком (GPCR), рецептори фактора росту (GFR) і рецептори інтегрину ( $\alpha_v \beta_3$  і  $\alpha_v \beta_5$ ).

В експерименті Chang CC, Liu DZ та Lin SY використовували аналог гормону соматостатину октреотид (ОСТ), циклічний октапептид, цей пептид був вперше зареєстрований у 2008 році в ліпосомній композиції для націлювання на рецептор соматостатину типу 2 (SSTR2), підтип рецептора, який значно надмірно експресується при дрібноклітинному раку легенів і раку молочної залози. У дослідженні повідомлялося про композицію ліпосом, поєднану з ОСТ на поверхні ліпосом, яка містить природний протипухлинний агент кантаридин. Результати *in vitro* та *in vivo* показали підвищену протипухлинну ефективність препарату зі зниженою токсичністю препарату. Дослідження показало, що кон'югована з ОСТ ліпосома містить два протипухлинні агенти, доксорубіцин (DOX) і комплекси платини. Результати показали, що підготовлені ліпосоми являють собою нову цільову селективну систему вантажу для доставки активної речовини на основі платини

(наприклад, цисплатину) і цитотоксичного препарату DOX до клітин, які надлишково експресують рецептори соматостатину SSTR2 і SSTR5.

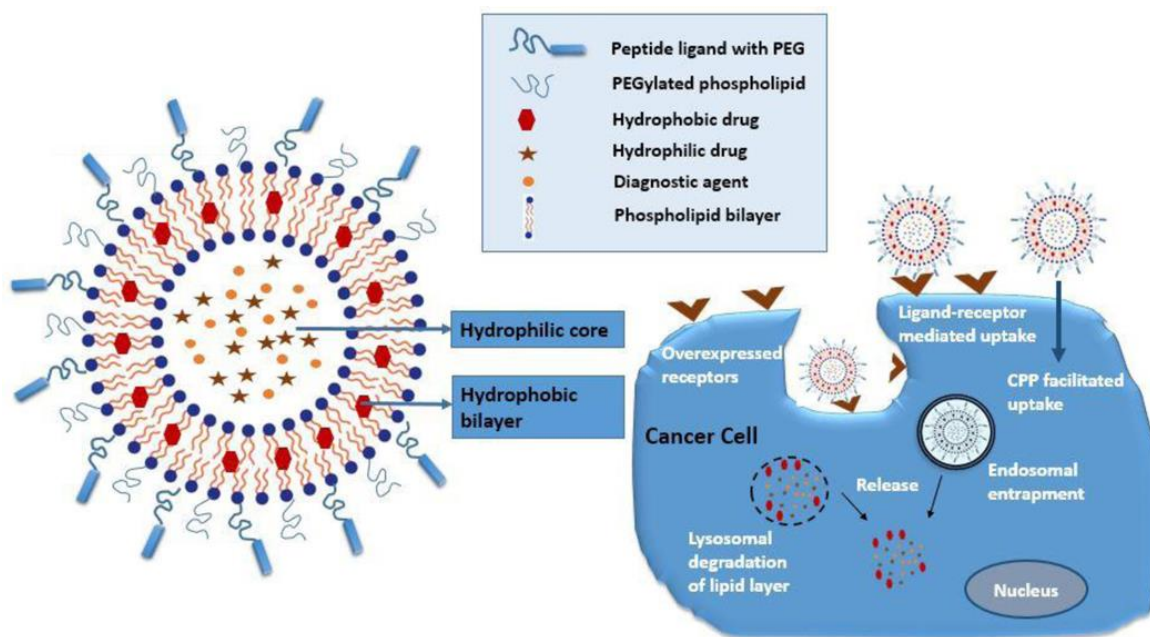


Рисунок 3.4 – Схематичне представлення функціоналізованих пептидно-націлених ліпосом механізму доставки ативних речовин за допомогою активного націлювання на ракові клітини з гіперекспресією цільових рецепторів [20].

Цільові ліпосоми, функціоналізовані активними пептидами, або вибірково зв'язуються з рецепторами з надлишковою експресією на ракових клітинах і проникають всередину через опосередкований рецепторами ендоцитоз, або проникають всередину ракових клітин через поглинання, опосередковане проникаючим у клітину пептидом (CPP). Потім БАР та діагностичні засоби можуть вивільнятися через ендосомну або лізосомну деградацію ліпідних шарів.

## 4 МЕТОДИ МОДЕЛЮВАННЯ ЛІПІДНИХ КОНТЕЙНЕРІВ

### 4.1 Формування ліпосом методом екструзії

Ліпідні візікули отримували методом екструзії за допомогою LiposoFast System (Avestin). Попередньо формували ліпідну плівку із суміші фосфатидилхоліну, холестерину та Rh-PE (молярне співвідношення 7:3:0,1) у хлороформі. До суміші ліпідів додавали мічений родаміном (Rh) фосфатидилетаноламін з метою маркування ліпідних везикул (Rh-PE) та інші компоненти PEG, pNP-PEG-PE, чи NGPE з метою моделювання складу ліпосом для доставки БАР. Хлороформ видаляли на роторному випарнику з подальшим сублімаційним сушінням на Freeze Dry System Freezone 4.5. Плівку гідратували буферним розчином протягом 5 хв. При постійному перемішуванні при кімнатній температурі. Ліпідну дисперсію екструдували 40 разів через полікарбонатні фільтри (200 нм). Розмір везикул контролювали за допомогою субмікронного аналізатора частинок Coulter N4 Plus [26].

### 4.2 Завантаження ліпосом пептидом ТАТ

ТАТ пептид – це 11-мерний пептид з наступним амінокислотним складом: TyrGlyArgLysLysArgArgGlnArgArgArg; молекулярна маса 1,560 Da; в складі пептиду три реакційноздатні аміногрупи. Приєднання пептиду ТАТ до ліпосом здійснювали за двома протоколами. Пептид ТАТ з'єднувався з попередньо сформованими ліпосомами. Суміш з 0,2 мл ліпосом у MES (pH 5,5), 40 мкл 0,25 М 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл) карбодііміду та 40 мкл

0,1 М N – гідроксисульфосукциніміду інкубували протягом 10 хв. Потім до активованих ліпосом додавали 400 мкл розчину пептиду ТАТ («холодного» або міченого  $^{111}\text{In}$ ) у 50 мМ тетраборату Na з 0,1 М NaCl (рН 7,4), суміш інкубували протягом 3 год при 20°C. Вільний пептид ТАТ відокремлювали на колонці BioGel 1,5А.

ПЕГильовані ліпосоми формували з додаванням в ліпідну суміш рNP-PEG-PE. Синтез рNP-PEG-PE проводили, взаємодією PE з 10-кратним молярним надлишком PEG-(рNP)<sub>2</sub> в хлороформі в присутності триетиламіну. Органічні розчинники видалили, і міцели рNP-PEG-PE утворили в 0,01 М HCl/0,15 М NaCl за допомогою ультразвукової обробки, відокремили від вільного PEG і рNP на колонці CL-4В і ліофілізували. рNP-PEG-PE екстрагували хлороформом і зберігали при -80°C.

З метою кількісної оцінки пептиду ТАТ, зв'язаного з окремою ліпосомою, пептид ТАТ мітили  $^{111}\text{In}$  [26].

#### 4.3 Формування ліпідних контейнерів методом ультразвукової обробки

Ліпідні контейнери отримували із суміші простих ліпідів. Суміш із молярним співвідношенням 3:7 пальмітинової кислоти (РА) та холестерину розчиняли в складному розчиннику бензол : метанол (9:1). Розчин піддавали швидкому заморожуванню рідким азотом і потім ліофілізували протягом 24 годин для забезпечення повної сублімації органічного розчинника. Ліофілізований порошок гідратували водним розчином ICG (0,2 мг/мл, рН 8,8). Суспензію піддавали обробці заморожування/розморожування (від рідкого азоту протягом 2 хвилин до водяної бані при 70°C протягом 10 хвилин) протягом п'яти циклів зі струшуванням між послідовними циклами для повної гідратації. Після останнього циклу суспензію обробляли ультразвуком

протягом 25 хвилин. Схема отримання препарату ліпосом показана на рис.4.1 [27].

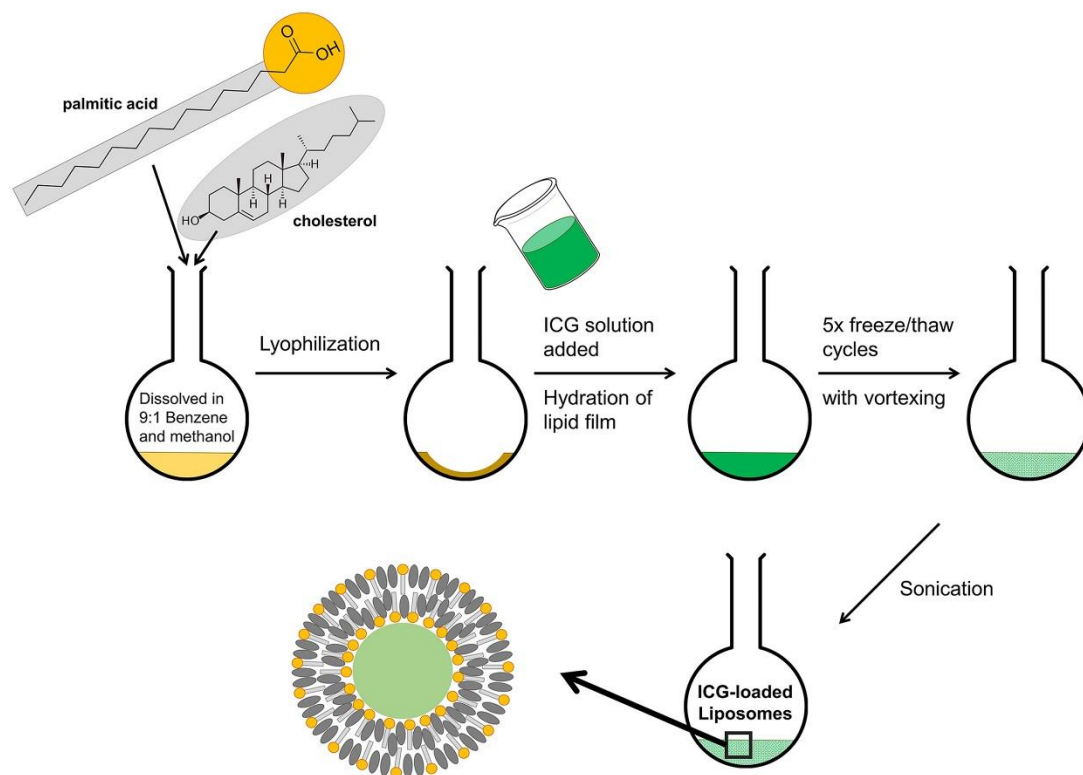


Рисунок 4.1 – Схема методу тонкоплівкової гідrataції, що використовується для виготовлення ліпосом пальмітинової кислоти/холестерину, завантажених активною речовиною ICG [27].

#### 4.4 Завантаження ліпідних контейнерів ICG

Ліпідні контейнери інкубували з флуоресцентним барвником індоціаніном зеленим (ICG 0,2 мг/мл, рН 8,8). За допомогою колонки Sephadex G-50 здійснювали розділ фази вільного ICG від фази ліпосом, завантажених ICG. Порожні ліпосоми були сформовані за подібною процедурою, розчин ICG замінили буфером TRIS (рН 8,8) [27].

#### 4.5 Мішені для цільової доставки БАР в складі ліпідних контейнерів

Об'єктами дослідження були клітини пухлини молочної залози людини (BT20), карцинома легенів Льюїса (LLC) і ембріональні серцеві міоцити щурів (H9C2). Клітини підтримували на відповідних розчинах культивування: BT20 в розчині з 10 мМ пірувату, незамінних амінокислот, L-глутаміну та 10% FBS; клітини LLC та H9C2 в середовищі з 10% FBS. Усі клітини витримували в атмосфері 6% CO<sub>2</sub> при 37°C [27].

## 5 ЛІПОСОМАЛЬНІ КОНТЕЙНЕРИ ЯК ПОТЕНЦІЙНІ ЗАСОБИ ДОСТАВКИ БАР

З метою дослідження спроможності ліпосомальних контейнерів доставляти біологічно активні речовини в роботі використовувалися фосфоліпідні ліпосоми модифіковані пептидом ТАТ на поверхні везикул [26] та нефосфоліпідні ліпосоми на основі холестерина і пальмітинової кислоти [27] завантажені ICG.

### 5.1 Властивості ліпосом для перенесення барвника ICG в клітини

Ліпосоми, завантажені ICG, виготовлені з використанням простого ліпосомального складу розглядаються як такі, які мають потенціал для різноманітних застосувань, включаючи ініційовану доставку ліків, візуалізацію *in vivo* та термічну абляційну терапію [27].

ICG є єдиним флуоресцентним барвником ближнього інфрачервоного діапазону, який широко використовується в клінічній діагностичній практиці, для визначення серцевого викиду, функції печінки та виконання ангиографії. Для дослідження ефективності перенесення ICG в клітинах авторами були використані нефосфоліпідні ліпосоми, утворені з одноланцюгових амфифільних молекул і високого вмісту стеринів, що мають значно більшу стабільність у порівнянні з фосфоліпідними везикулами [27]. Отримані ліпідні контейнери характеризували за розміром, ефективністю інкапсуляції, стабільністю та фототермічним відгуком. Біосумісні та хімічно інертні матеріали холестерин і пальмітинова кислота використовувалися для виготовлення ліпосом з низькою проникністю. Результати експерименту показують, що суспензія ліпосом є стабільною та зберігає ICG понад 4 тижнів

і візуально являє собою видимий, неагрегований, кольоровий розчин. В процесі досліджень встановлено, що кількість ICG, інкапсульованого в ліпосомах, з часом зменшується, лише 43% початкового вмісту ICG залишається в ліпосомах через 4 тижні (рис. 5.1). Флуоресцентний барвник впливає на поверхневі електричні властивості модельних мембран.  $\zeta$ -потенціал для ліпосом, навантажених ICG, становив  $-67,3 \pm 6,7$  мВ, що відповідає депротонованій формі карбоксилатної групи при фізіологічному рН.  $\zeta$ -потенціал для контрольних ліпосом був  $-81 \pm 12,5$  мВ. Ця різниця була статистично значущою на основі двобічного t-тесту ( $p=0,01$ ).

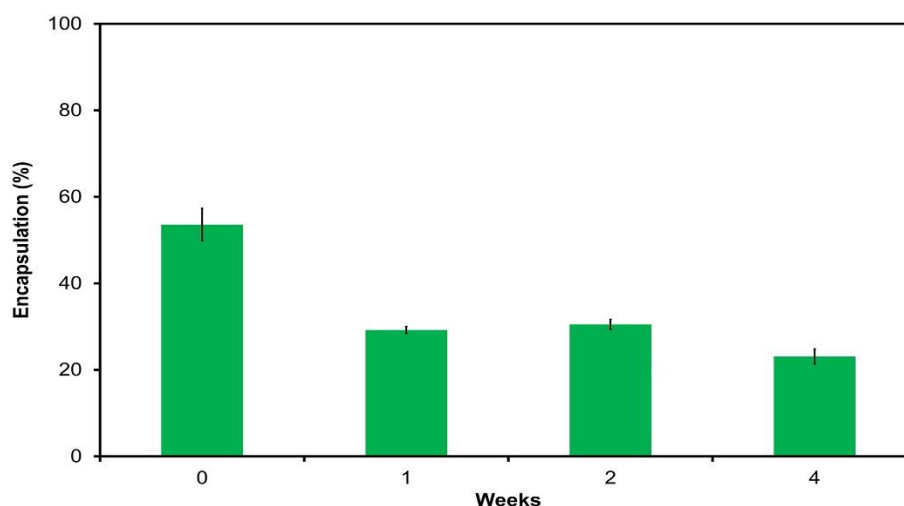


Рисунок 5.1 – Відсоток інкапсуляції ICG в ліпосомах протягом чотирьох тижнів. Ефективність інкапсуляції знизилася з  $53,6 \pm 3,7\%$  після виготовлення до  $29,2 \pm 0,8\%$  через один тиждень. Дані представлені як середнє  $\pm$  стандартне відхилення ( $n=3$ ) [27].

З метою вивчення стабільності модельних мембран розмір ліпосом контролювали протягом 12 тижнів за допомогою аналізу динамічного розсіювання світла (рис. 5.2А). Встановлено, що ліпосоми, навантажені ICG, були в середньому більшими, ніж контрольні ліпосоми із загальним середнім діаметром 167 нм і 143 нм відповідно. Cryo-ТЕМ дослідження ліпосом

показує, що більшість є сферичними одношаровими везикулами, однак також присутні деякі багат шарові везикули та паличкоподібні частинки (рис. 5.2В) [27]. Двосторонній дисперсійний аналіз дослідження ліпідних везикул визначив, що середня часова зміна діаметра у ICG-ліпосомах і контрольних порожніх ліпосомах не була статистично значущою, і що не було статистично значущої різниці між двома групами в будь-який час вимірювання. Середній індекс полідисперсності (PDI) для обох груп був низьким ( $PDI < 0,2$ ), що свідчить про хорошу однорідність, і не було статистично значущої різниці в середньому PDI протягом 12 тижнів як для ліпосом, завантажених ICG, так і для контрольних ліпосом. Типові частотні гістограми, що показують діапазон розмірів для ліпосом, завантажених ICG, і контрольних ліпосом, показані на (рис. 5.2С). Стабільність ліпосом, завантажених ICG, у моделюваному фізіологічному середовищі (PBS з 10% FBS) протягом 7 днів не виявила статистично значущих часових змін у діаметрі ліпосом, але середній діаметр був значно більшим ( $>1$  мкм). [27]

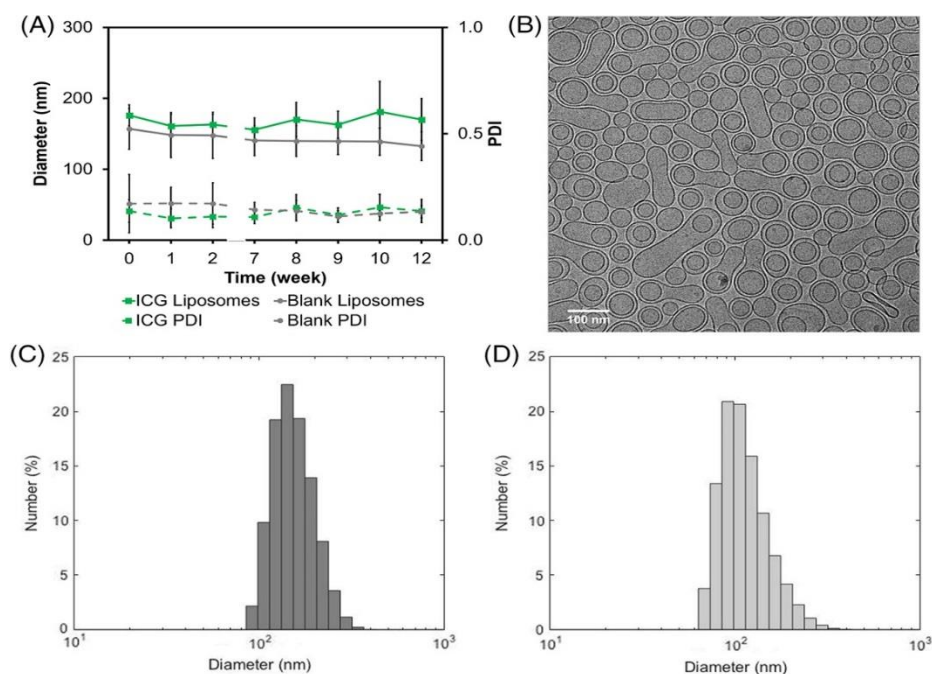


Рисунок 5.2 А – Зміна діаметра ліпосоми та PDI з часом: ліпосом завантажених ICG (■), порожніх ліпосом (●). В - КріоТЕМ-зображення

ліпосом у деіонізованій H<sub>2</sub>O. Масштаб шкали 100 нм. Репрезентативні частотні гістограми, що показують діапазон розмірів С - ліпосом, завантажених ICG, D - порожніх ліпосом за день. «Рисунок 5.2 А, аркуш 42»

В свою чергу нефосфоліпідні ліпосомальні контейнери виготовлені з тонкої плівки пальмітинової кислоти та холестерину, завантажені ICG показали високу стабільність навіть впродовж тижня [27]. Окрім цього не було виявлено статистично значущих відмінностей в змінах розміру ліпосом після інтенсивного опромінення 750 мВт NIR (ближнього інфрачервоного світла) протягом 2 хвилин, діапазон опромінення відповідає піку поглинання ICG. Як зазначають автори, експериментальні дані отримані на нефосфоліпідних ліпосомах суттєво контрастувало з проведеними дослідженнями на фосфоліпідних ліпосомах. Автори повідомляють про нестабільність фосфоліпідних ліпосом через гідроліз фосфатних груп у ліпосомах та їх агрегацію [29]. Ліпосомальні контейнери на основі холестерину і пальмітинової кислоти зарекомендували себе, як стабільні переносники флуоресцентних активних речовин, подібних ICG.

## 5.2 Властивості ліпосом з вмістом пептиду ТАТ для перенесення БАР

Автори статті зазначають, що білок *транс*-активуючого транскрипційного активатора (ТАТ) (86-мерного поліпептиду) з ВЛ-1 може доволі легко проникати через молекулярні мембрани клітин, яка є основною перешкодою у доставці активних речовин у цитоплазму клітини савців. В такий спосіб авторам вдалося доставити β-галактозидазу, приєднану до білка ТАТ, у всі тканини мишей, навіть у мозок [26].

Певні невеликі фрагменти таких білків (10–16-мери), які називаються доменами білкової трансдукції (PTD), і деякі пептиди також ефективно перетинають біологічні мембрани. Цей процес не залежить від рецепторів і транспортерів, не опосередкований ендоцитозом і може бути спрямований безпосередньо на ліпідний шар. Загальні структурні особливості ТАТ PTD включають наявність багатьох основних амінокислот (аргініну та лізину), а також здатність приймати альфа-спіральну конформацію. Можна припустити, що позитивний заряд є ключовою властивістю, що забезпечує транслокаційну активність цих пептидів. Це було підтверджено тим фактом, що серед набору 12-мерних пептидних послідовностей, синтезованих Мі *et al.* , тільки послідовності з високим вмістом катіонного заряду сприяли трансдукції в різних клітинах і забезпечували ефективну доставку білка в синовіальні та пухлинні клітини *in vivo* [31]. Однак не всі катіонні пептиди продемонстрували таку високу трансдукційну активність.

У своєму дослідженні Vladimir P. Torchilin, Ram Rammohan змогли продемонструвати, що відносно великі 200-нм немодифіковані та модифіковані поліетиленгліколем (ПЕГильовані) ліпосоми можуть бути доставлені в різні клітини за допомогою кількох молекул пептиду ТАТ, прикріплених до поверхні ліпосоми через новий спейсер, *n* - нітрофенілкарбоніл-PEG-фосфатидилетаноламін (pNP-PEG-PE) [26].

В експериментах автори використовували ліпосомальні контейнери, що мали приблизно однаковий середній діаметр 150–200 нм. та відрізнялися наявністю в складі ліпосом додаткових молекулярних структур: LIP – чисті ліпосоми, LIP-NGPE-TAT – з вмістом ТАТ через спейсер NGPE, LIP-PEG-TAT(5000), LIP-pNP-PEG-TAT(3000) – ПЕГильовані (5000)/(3000) ліпосоми з вмістом ТАТ [26]. Ліпосомальні контейнери є доволі великими за розмірами агентами. Дослідження структури розподілу за розміром модельних фосфоліпідних везикул з молекулярним навантаженням представлені на рисунку 5.3.

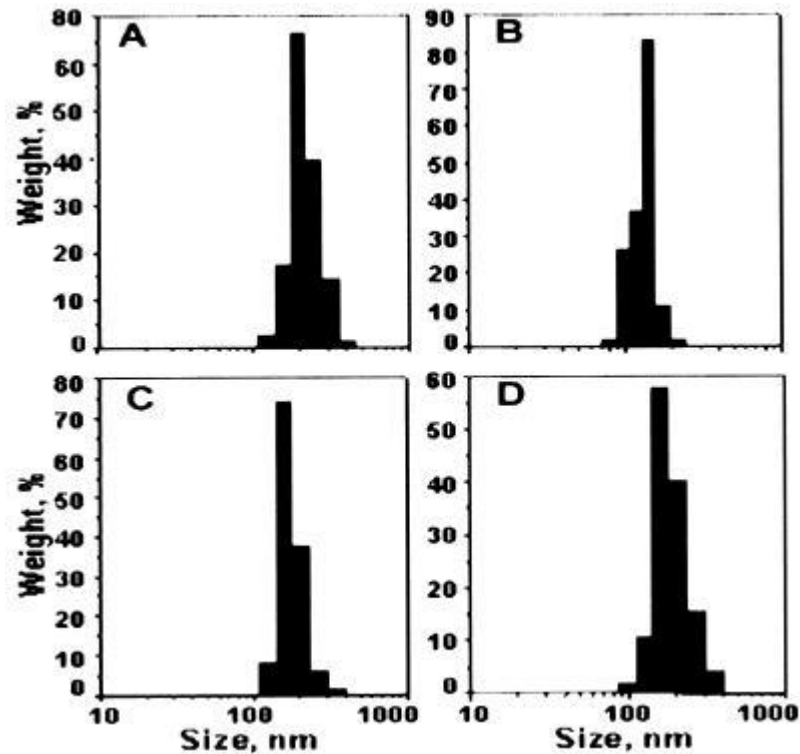


Рисунок 5.3 – Структури розподілу за розмірами для різних ліпосомальних препаратів, використаних у дослідженні: LIP (A), LIP-NGPE-TAT (B), LIP-PEG(5000) (C), LIP-pNP-PEG(3000) (D) [27].

Гіпотетичні варіанти взаємодії ліпосом завантажених TAT – пептидом з поверхнею клітинною мембрани показані на рис. 5.4: TAT – пептид локалізований безпосередньо на поверхні ліпосом (A); TAT – пептид взаємодіє з клітинною поверхнею і утримується на поверхні ліпосоми через PEG спейсер (B); TAT – пептид приєднаний до ПЕГильованих ліпосом, при цьому товща захисного PEG шару менша за довжину PEG спейсера (C); TAT – пептид приєднаний до ПЕГильованих ліпосом, при цьому товща захисного PEG шару більша за довжину PEG спейсера (D).

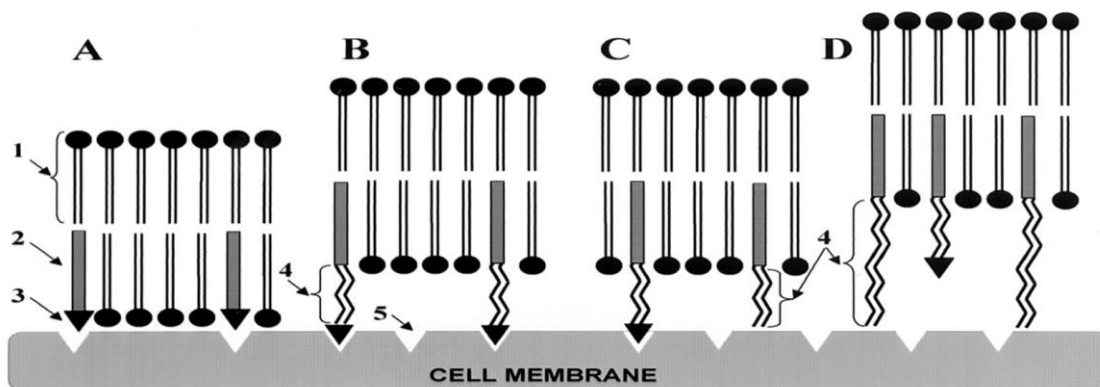


Рисунок 5.4 Схематичне представлення взаємодії ТАТ - завантажених ліпосом з клітинною поверхнею: LIP-NGPE-TAT (A), LIP-pNP-PEG(3000)-TAT (B), LIP-PEG(2000)/pNP-PEG(3000)-TAT (C), and LIP-PEG(5000)/pNP-PEG(3000)-TAT (D). Позначення: 1 – фософоліпіди ліпосом; 2 - PE – якор для ТАТ пептиду або ТАТ – пептид зв’язаний з PEG спейсером; 3 – ТАТ - пептид; 4 – PEG ланцюги різної довжини; 5 – гіпотетичні сайти впізнавання ТАТ пептиду і взаємодії з клітинною поверхнею [26].

Результати дослідження взаємодії різних ліпосомальних препаратів з усіма досліджуваними клітинами (LLC, BT20 і H9C2) при 37 °C представлені на Рис. 17 та 18. В якості негативного контролю були досліджувані клітини, які не були оброблені Rh-PE-міченим LIP, LIP-PEG(5000) або LIP-pNP-PEG(3000)-PE (ці три зразки являють собою негативний контроль) і LIP-NGPE-TAT або LIP-PEG(5000)/pNP-PEG(3000)-TAT демонструє внутрішньоклітинну флуоресценцію після інкубації з ліпосомами та подальшого промивання. (рис. 5.5A–C і рис. 5.6A–C). Водночас усі клітини, оброблені в подібних умовах Rh-PE-міченим LIP-pNP-PEG(3000)-TAT або LIP-PEG(2000)/pNP-PEG (3000)-TAT, демонструють високу внутрішньоклітинну флуоресценцію, тобто, інтерналізацію ліпосом ( рис.5.5 D і E та рис.5.6 D і E) [26].

Результати конфокальної мікроскопії (рис. 5.5 F і G) чітко підтверджують внутрішньоклітинну локалізацію ліпосом ТАТ, оскільки

очевидну більшість флуоресценції, пов'язаної з ліпосомами, можна побачити всередині клітини (якщо одну клітину розглядати в середині товщини клітини), а не на поверхні клітини. Таким чином, стеричні перешкоди, створені поверхнею ліпосоми або молекулами ПЕГ з вищою молекулярною масою, ніж у рNP-PEG-PE, до якого приєднаний пептид ТАТ, не дозволяють взаємодії пептиду ТАТ з клітиною і запобігають інтерналізації ліпосом [26]. На відміну від цього, ліпосомальні препарати, що не мають стеричних перешкод у вигляді подовжених ланцюгів ПЕГ, дозволяють багаточисельну взаємодію між приєднаним до ліпосом пептидом ТАТ і поверхнею клітини та подальшу інтерналізацію ліпосом. Таким чином, навіть такі відносно великі частинки, як 150–200 нм звичайні та пегільовані (довгоциркулюючі) ліпосоми, можуть бути ефективно транслоковані всередині різних клітин, якщо достатня кількість молекул пептиду ТАТ прикріплена до поверхні ліпосом таким чином, щоб забезпечити вільну взаємодію між ними [26].

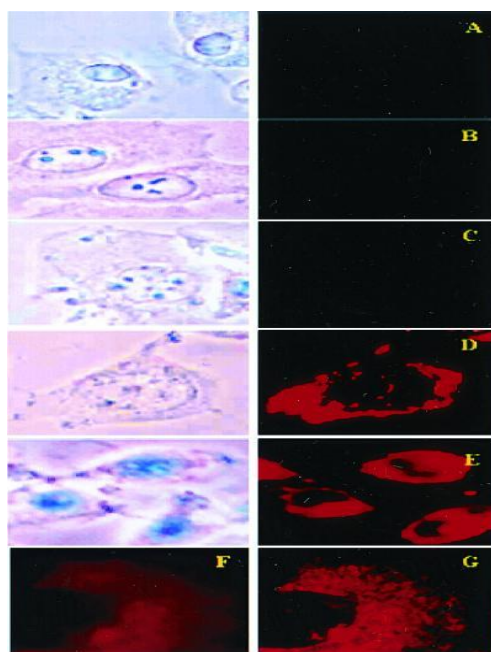


Рисунок 5.5 – Світлопольна (ліворуч) і флуоресцентна (праворуч) мікроскопія клітинних культур, оброблених різними препаратами Rh-PE-мічених ліпосом (37°C; ×600): H9C2 і LIP (A), BT20 і LIP-pNP-PEG(3000) (B), BT20 і LIP-

NGPE-TAT (C), BT20 і LIP-pNP-PEG(3000)-TAT (D) і LLC і LIP-pNP-PEG(3000)-TAT (E) [26]. «Рисунок 5.5, аркуш 47»

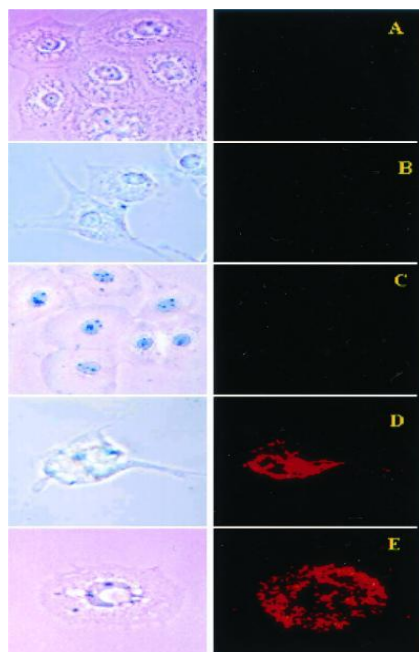


Рисунок 5.6 Світлопольна (ліворуч) і флуоресцентна (праворуч) мікроскопія клітинних культур, оброблених Rh-PE-ліпосомами (37°C; ×400): BT20 і LIP-PEG(2000) (A), H9C2 і LIP-PEG(5000) /pNP-PEG(3000)-TAT (B), BT20 і LIP-PEG(5000)/pNP-PEG(3000)-TAT (C), H9C2 і LIP-PEG(2000)/pNP-PEG(3000)-TAT (D) і BT20 і LIP-PEG(2000)/pNP-PEG(3000)-TAT (E) [26].

Під час дослідження було виявлено особливість перерозподілу в клітинному просторі пептиду TAT в вільному стані та в комплексі LIP-TAT. Після 1 години спостереження в мікроскоп (інтервал часу, який використовувався в експерименті) LIP-TAT розподілявся в цитоплазмі, демонструючи лише мінімальний зв'язок з клітинним ядром, тоді як вільний пептид TAT в багатьох випадках демонстрував ядерну локалізацію. Таке явище авторами пояснюється більш повільною внутрішньоклітинною міграцією ліпосом великих за розмірами або їх ускладненою взаємодією з ядрами, знову ж таки, за рахунок великих розмірів [26].

Результатом своїх досліджень автори підтверджують принцип ефективної опосередкованої ТАТ пептидом трансдукції звичайних і стерично захищених ліпосомальних контейнерів та їх вмісту в клітини [26]. Пептид ТАТ, прикріплений до поверхні ліпосоми, повинен бути неекранованим і доступним для взаємодії з клітинною мембраною, саме така молекулярна конструкція забезпечує найбільш ефективні умови взаємодії транспортних біологічних контейнерів з клітинами.

## ВИСНОВКИ

1. Ліпідні контейнери, як засоби цільової доставки біологічно активних речовин знаходять своє місце в практичному застосуванні на тлі масштабних наукових досліджень щодо їх модифікацій.
2. Сучасні методи фізико-хімічної модифікації ліпосомальних контейнерів дозволяють отримати універсальні засоби цільової доставки біологічно активних речовин. Модифікації ліпідних бішарів молекулами холестерину сприяє формуванню ліпідної упаковки різної щільності, що в свою чергу впливає на стабільність ліпосомальних контейнерів щодо дії рН та температури навколишнього середовища.
3. Модернізації ліпосомальних везикул різними типами пептидів дозволяє «пасивно націлювати» ліпосомальні контейнери на групу клітин для подальшого вивільнення біологічно активної речовини, уникаючи при цьому контакту з нецільовими клітинами. Встановлена висока ефективність перерозподілу в клітину-мішень ліпосом завантажентх ТАТ пептидом за рахунок багатоточкової взаємодії між приєднаним до ліпосом пептидом ТАТ і поверхнею клітини при цьому забезпечується подальша інтерналізація ліпосом.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S. et al. Liposome: classification, preparation, and applications *Nanoscale Res Lett* 8, 102 (2013). <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>.
2. Large DE, Abdelmessih RG, Fink EA, Auguste DT. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021 Sep doi: 10.1016/j.addr.2021.113851.
3. Jelske N. van der Veen, John P. Kennelly, Sereana Wan, Jean E. Vance, Dennis E. Vance, René L. Jacobs, The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease, *Biochimica et Biophysica Acta P.* 1558-1572.
4. Liu P, Chen G, Zhang J. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. *Molecules.* 2022 Feb 17; 27 (4) P. 1372. doi: 10.3390/molecules27041372.
5. van Hoogevest P, Wendel A. The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2014 Sep; 116 (9) P. 1088-1107. doi: 10.1002/ejlt.201400219. Epub 2014 Aug 25.
6. Smith MC, Crist RM, Clogston JD, McNeil SE. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. // *Anal Bioanal Chem.* 2017 Sep; 409 (24) P. 5779-5787.
7. Philip L. Yeagle. *The Membranes of Cells.* – 2015. – 542 p.
8. Cribier S, Morrot G, Zachowski A. Dynamics of the membrane lipid phase. // *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1993 Jan;48(1):27-32.
9. Derek M. *Handbook of Lipid Bilayers.* CRC Press LLC, 2013. - 1174 ]
10. Курський М. Д., Курченко С. М. *Біомембранологія.* – Київ: Вища школа, 1993. – 260 с.

- 11.Sahoo SK, Labhasetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. // Drug Discov Today. 2003 Dec 15; 8 (24): P. 1112-20. doi: 10.1016/s1359-6446(03)02903-9.
- 12.Yogita P. Patil, Sameer Jadhav,Novel methods for liposome preparation,Chemistry and Physics of Lipids,Volume 177,2014,P 8-18.
- 13.Zhang JA, Pawelchak J. Effect of pH, ionic strength and oxygen burden on the chemical stability of EPC/cholesterol liposomes under accelerated conditions. Part 1: Lipid hydrolysis. Eur J Pharm Biopharm. 2000 Nov; 50 (3) P. 357-64. doi:10.1016/s0939-6411(00)00127-2..
- 14.Ndłkowski. WW, Pentak D, Novak. K. Ndłkowska, A. Effect of temperature, cholesterol content and pH on stability of liposomes.J. Mol. 2005.
- 15.Hamal P, Subasinghege Don V, Nguyenhuu H, Ranasinghe JC, Nauman JA, McCarley RL, Kumar R, Haber LH. Influence of Temperature on Molecular Adsorption and Transport at Liposome Surfaces Studied by Molecular Dynamics Simulations and Second Harmonic Generation Spectroscopy. J Phys Chem B. 2021 Sep 23; 125(37):10506-10513. doi:10.1021
- 16.Lewis RNAH, McElhaney RN. In: Yegle PL, editor. Structure of biological membranes. Boca Raton (Florida, USA): CRC Press, 1992. p. 73–156.
- 17.Demel RA , van Deenen LL, Pethica BA Biochem. biophys. Acta, 135 (1967), P.11
- 18.Lewis RNAH, McElhaney RN. In: Yegle PL, editor. Structure of biological membranes. Boca Raton (Florida, USA): CRC Press, 1992. p. 73–156.
- 19.Bhattacharya S, Haldar S. Interactions between cholesterol and lipids in bilayer membranes. Role of lipid headgroup and hydrocarbon chain-backbone linkage. Biochim Biophys Acta. 2000 Jul 31; 1467 (1) P. 39-53. doi:10.1016/s0005-2736(00)00196-6.
- 20.Nir S, Nieva JL. Interactions of peptides with liposomes: pore formation and fusion. Prog Lipid Res. 2000 Mar; 39 (2) P. 181-206. doi: 10.1016/s0163-7827(00)00004-7.

21. Allen TM. Liposomes. Opportunities in drug delivery. *Drugs*. 1997; 54 Suppl 4 P. 8-14. doi: 10.2165/00003495-199700544-00004..
22. Abu Lila AS, Ishida T. Liposomal Delivery Systems: Design Optimization and Current Applications. *Biol Pharm Bull*. 2017; 40 (1) P. 1-10. doi: 10.1248/bpb.b16-00624.
23. Antonia I, Antoniou, Sabrina Giofrè, Pierfausto Seneci, Daniele Passarella, Sara Pellegrino, Stimulus-responsive liposomes for biomedical applications P 1794-1824, 2021. <https://doi.org/10.1016>
24. Riaz MK, Riaz MA, Zhang X, Lin C, Wong KH, Chen X, Zhang G, Lu A, Yang Z. Surface Functionalization and Targeting Strategies of Liposomes in Solid Tumor Therapy: A Review. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan 9; 19 (1) P.195. doi: 10.3390
25. Sonju JJ, Dahal A, Singh SS, Jois SD. Peptide-functionalized liposomes as therapeutic and diagnostic tools for cancer treatment. *J Control Release*. 2021 Jan 10; 329 P. 624-644. doi: 10.1016
26. Torchilin VP, Rammohan R, Weissig V, Levchenko TS. TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 17; 98 (15) P.8786-91. doi: 10.1073
27. Linsley CS, Zhu M, Quach VY, Wu BM. Preparation of photothermal palmitic acid/cholesterol liposomes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2019 Jul; 107 (5) P. 1384-1392. doi: 10.1002
28. Garbuzenko O, Barenholz Y, Prievo A. Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer. *Chem Phys Lipids*. 2005 Jun; 135 (2) P.117-29. doi: 10.1016
29. Lajunen T, Kontturi LS, Viitala L, Manna M, Cramariuc O, Róg T, Bunker A, Laaksonen T, Viitala T, Murtomäki L, Urtti A. Indocyanine Green-Loaded Liposomes for Light-Triggered Drug Release. *Mol Pharm*. 2016 Jun 6; 13 (6) P.2095-107. doi: 10.1021

30. Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*. 1999 Sep 3; P. 285(5433):1569-72. doi: 10.1126
31. Mi Z, Mai J, Lu X, Robbins PD. Characterization of a class of cationic peptides able to facilitate efficient protein transduction in vitro and in vivo. *Mol Ther*. 2000 Oct; 2(4) P. 339-47. doi: 10.1006