

УДК 542; 544.77.022.532

КОНСТРУИРОВАНИЕ ТРАНСДЕРМАЛЬНЫХ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ С ЗАДАНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Л.М. Кузякова

(Ставропольский государственный университет; НПО «Пульс», г. Ставрополь)

Исследованы разные методы получения липосом, содержащих в своем составе компоненты растительного и животного происхождения. Показано, что метод выпаривания в обращенной фазе обеспечивает максимальное включение водной фазы, содержащей лекарственные препараты, в структуру липидных везикул. Полученные этим методом липидные везикулы имели внутренний объем 9 л на моль липидов и уровень включения водной фазы $78,5 \pm 2,5\%$. Обработка липосом ультразвуком, позволяет получить частицы более однородные по размерам со средним диаметром около 12 нм. Морфологическими исследованиями при витальной окраске доказано внутриклеточное проникновение содержимого липосом, сконструированных из комплекса растительного и животного сырья, в глубокие слои эпидермиса, в отличие от существующих представлений о только поверхностном воздействии липосомальных частиц. Определено оптимальное соотношение компонентов растительного и животного сырья для получения частиц с наибольшей проникающей способностью.

Существующий повышенный интерес к липосомам обусловлен уникальным комплексом физико-химических и биологических свойств данных микрочастиц, проявляемых *in vivo* и *in vitro*. Их химическая инертность, универсальность, биосовместимость, биodeградируемость, практическое отсутствие токсичных свойств и аллергических реакций в ответ на введение в организм, способность эффективно и целенаправленно взаимодействовать с определенными клетками организма, обеспечивая пролонгированное биологическое действие содержащихся в них соединений, открывают перед липосомами широкие возможности их использования с целью получения принципиально новых трансдермальных препаратов. Считается, что данные частицы могут быть универсальным транспортом лекарственных веществ к больному органу – мишени, в том числе и внутрь кожного покрова [1].

В литературе описаны четыре типа носителя, используемые для транспортировки внутрь кожного покрова как лекарственных, так и биологически активных веществ: липосомы, пористые микрочастицы, системы типа «ядро/оболочка» и матричные циклодекстрины [2]. Общей чертой этих систем является обеспечение пролонгированного высвобождения заключенного в носителе вещества, а также их выраженное предпочтение к инкапсулированию липофильных активных ингредиентов. В добавление к указанному свойству необходимо отметить способность

инкапсулировать во внутреннем объеме активные гидрофильные компоненты, а в своей оболочке – гидрофобные соединения.

Липосомы обладают меньшей стабильностью по сравнению с микрочастицами и циклодекстринами, но их способность укреплять барьерную функцию, амфифильность оболочки и биодоступность свидетельствуют о явном преимуществе как наиболее безопасного, относительно недорогого и прогрессивного в фармацевтической отрасли объекта инкапсулирования.

Для прохождения через эпидермис любой частице или веществу необходимо преодолеть узкие межклеточные промежутки. Показано, что крупные молекулы (белки, полисахариды) не в состоянии этого сделать. Кроме того, липиды, заполняющие эти промежутки, представляют собой гидрофобную среду, не пропускающую водорастворимые соединения. Насыщенные жиры впитываются плохо, так как, смешиваясь с эпидермальными липидами, они делают их более жесткими и менее проницаемыми. Поэтому препараты на их основе оказывают на кожный покров только поверхностное воздействие. Вместе с тем через липидный барьер легко просачиваются небольшие жирорастворимые молекулы – компоненты масел и жиров, разжижая липидные пласты и повышая их проницаемость [3].

Таким образом, оптимальные для транспортировки внутрь кожного покрова как лекарственных, так и

биологически активных веществ липосомальные частицы должны иметь в оболочке оптимальное соотношение гидрофильных и гидрофобных участков молекул. Так как для практического использования данных частиц важна не только скорость, но и глубина проникновения биологически активных веществ, критерием их эффективности может служить экспериментальное подтверждение способности проникновения в эпидермис активных ингредиентов.

Экспериментальная часть

Для конструирования липосом использовали фосфолипиды животного и растительного происхождения, выделенные по методикам [4–6]. В качестве животного сырья был взят головной мозг крупного рогатого скота, в качестве растительного сырья – отходы маслоэкстракционных заводов (гидрофусы и фосфатиды). Фракционный состав суммарных экстрактов (табл. 1) полученных липидов изучали с помощью тонкослойной хроматографии.

Сопоставляя полученные результаты, можно отметить, что фракционный состав липидов и величины R_f анализируемого растительного и животного сырья идентичны и в целом соответствуют литературным данным [7]. Сравнение фракционного состава суммарных липидов, полученных из растительных фосфатидов и головного мозга быка, показало, что последние дополнительно содержат сфингомиелин, кардиолипин, цереброзиды и холестерин, а фитогликолипиды можно извлечь только из растительного сырья. Поэтому мы использовали в комплексе липиды головного мозга крупного рогатого скота, а также гидрофусы и фосфатиды (водные и высушенные остатки), полученные после маслоэкстракционной переработки семян подсолнечника.

Считается [8], что липиды играют важную роль при возникновении иммунного ответа клеток, обеспечивая специфическое комплексообразование. В этом процессе важную роль играют гликолипиды (ганглиозиды), участвующие в межклеточных взаимодействиях и являющиеся специфическими рецепторами ряда биологически активных веществ [9]. Каждому типу мембран соответствует определенное, характерное только для него соотношение полярных липидов [10].

Мы полагаем, что при использовании в качестве сырья для производства липосом смеси растительных и животных экстрактов может быть обеспечено оптимальное формирование мембран бислоиных липидных везикул из максимального числа липидов, за

счет которых происходит взаимодействие липосом с различными клетками макроорганизма и включение в состав последних необходимых липидов. Липосомы при этом взаимодействуют с поврежденными клетками, например, при ожогах, регенерируя их мембрану. На основании вышесказанного была разработана новая методика подбора растительного и животного сырья для производства липосом.

Таблица 1

Фракционный состав суммарных экстрактов липидов растительного и животного сырья ($M \pm m$)

Липиды	R_f	
	растительное сырье	животное сырье
Фосфатидилсерин	0,15±0,01	0,15±0,01
Фосфатидилинозит	0,25±0,01	0,25±0,01
Фосфатидилхолин	0,35±0,01	0,33±0,01
Фитогликолипиды	0,50±0,03	–
Фосфатидилэтаноламин	0,61±0,02	0,60±0,01
Фосфатидная кислота	0,74±0,02	0,75±0,02
Сфингомиелин	–	0,17±0,01
Кардиолипин	–	0,69±0,02
Цереброзиды	–	0,73±0,02
Лизофосфатидная кислота	–	0,70±0,02
Холестерин	–	0,90±0,02
Не идентифицированные пятна	0,11±0,02	0,52±0,01
Не идентифицированные пятна	0,95±0,03	0,49±0,02
Не идентифицированные пятна	–	0,29±0,01

Соотношение липидов растительного и животного соотношения подбирали на основе биомоделирования. В качестве биомодели использовали тест-культуру *Paramecium caudatum*. Для эксперимента были взяты следующие процентные соотношения растительного и животного сырья 50:50; 70:30 и 90:10. Биологическую активность липосомальных эмульсий оценивали по величине пороговой концентрации (методика [11]). Известно, что чем меньше пороговая концентрация у парameций, тем выше активность исследуемых препаратов.

При естественном наблюдении за парameциями под микроскопом изучали изменения формы клеток и поведенческие реакции. В ходе “острого” опыта (время экспозиции 1 сут) оценивали степень биологической активности интактных липосомальных эмульсий в разведении 10^{-1} – 10^{-9} .

Установлено, что липосомы, полученные из смеси растительных (90%) и животных (10%) фосфолипидов, являются биологически наиболее активными препаратами. Пороговая концентрация составляет для них 10^{-1} , тогда как для липидных везикул животного происхождения данная концентрация является лизирующей. Для липосом, полученных при других соотношениях сырьевых объектов, пороговая концентрация составляет 10^{-2} .

В процессе определения токсичности липосомальной эмульсии в хроническом опыте выявлено, что за время экспозиции 7 сут количество живых особей парameций осталось неизменным в растворе липосомальной эмульсии, полученном при соотношении

90:10, начиная с концентрации 10^{-2} . Данная эмульсия оказывала заметное стимулирующее действие по размножению парameций при разведении до 10^{-7} . Для липосом животного происхождения токсичными оказались концентрации при разведении 10^{-1} – 10^{-4} , а стимулирующее действие на размножение парameций оказала концентрация при разведении свыше 10^{-7} . Полученные в ходе эксперимента данные представлены на рис. 1, где показано, что оптимальный результат достигается при применении для конструирования липосом процентного соотношения фосфолипидов растительного и животного происхождения 90:10. Следует заметить, что исследуемые соотношения компонентов выбирали с учетом технологической целесообразности. Вполне вероятно, что для разных типов эпидермиса оптимальное соотношение фосфолипидов растительного и животного происхождения при конструировании липосом будет разным.

С целью определения пенетрирующей способности липосом и глубины проникновения липидных везикул на кожу морских свинок наносили витальную окраску кислотного красителя трипанового синего. Известно, что прижизненные красители делятся на основные и кислотные. Основные красители легко воспринимаются всеми клетками, особенно теми, в состав которых входят липиды. Это свойство обеспечивает глубокое проникновение основного красителя в ткани без использования дополнительных транспортных средств. Кислотные красители окрашивают лишь некоторые виды клеток и для их быстрого транспорта в глубину тканей и/или внутрь клеток

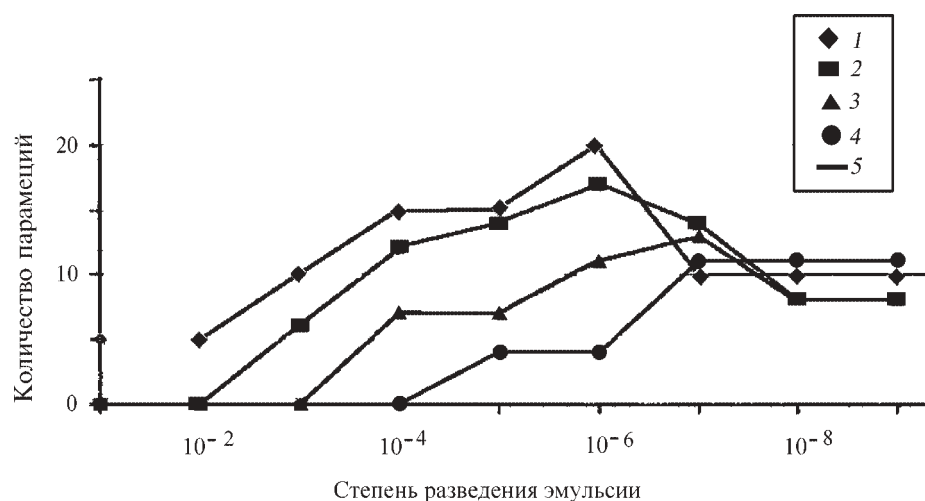


Рис. 1. Характеристика биологической активности липосомальных эмульсий при процентном содержании фосфолипидов растительного и животного происхождения: 1 – 90:10, 2 – 70:30, 3 – 50:50, 4 – животные фосфолипиды, 5 – контроль

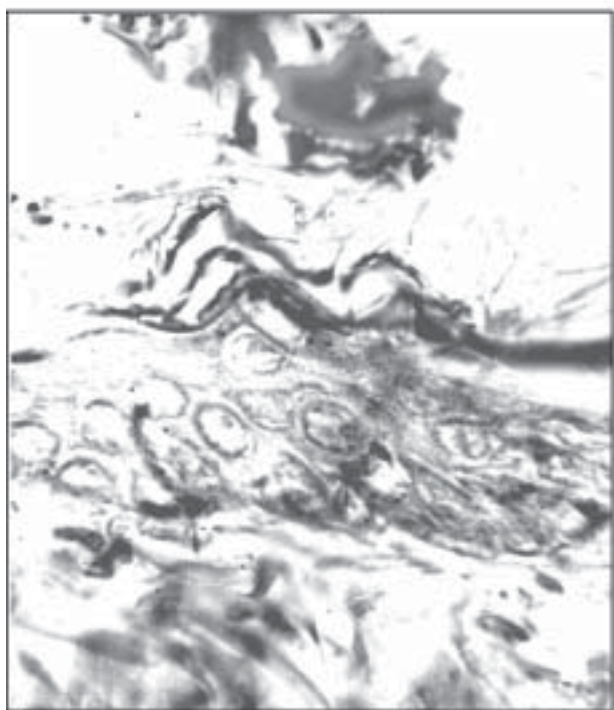


Рис. 2. Участок кожи морских свинок при витальной окраске кислотным красителем при увеличении 7×90

требуются дополнительные усилия [12].

Животные, взятые в эксперимент, были разделены на две группы по 7 свинок в каждой. Первой группе животных наносили на кожу только интактный раствор кислотного красителя трипанового синего. Второй группе – липидные везикулы с включенным внутрь кислотным красителем. Для морфологических исследований срезы кожи окрашивали нейтральным красным. Краску наносили методом кожной аппликации. Забор материала для исследования проводили через 0,5; 1; 3 и 6 ч. Препараты изучали под микроскопом при увеличении 7×90.

Исследование показало, что в первой группе животных через 30 мин происходит прокрашивание интактным красителем только рогового слоя эпителия. Через 1 ч трипановый синий достигает остистого слоя эпителия, неравномерно прокрашивая ткань и образуя скопления в отдельных участках эпидермиса, т.е. краситель проникает только в межклеточное пространство (рис. 2).

За тот же промежуток времени краситель в липосомальной форме прокрашивает клетки более глубоких слоев эпителия. Основное количество краски скапливается в роговом и блестящем слоях эпителия. Линия прокрашки наблюдается и в зернистом слое, в том числе и внутри живых клеток (рис. 3).

Таким образом, проведенные морфологические исследования при витальной окраске кислотным красителем трипановым синим подтверждают внутриклеточное проникновение содержимого липосом, сконструированных из комплекса растительного и животного сырья, в глубокие слои эпидермиса, в отличие от представлений о только межклеточном проникновении липосом [3].

В настоящее время предложено много разнообразных способов конструирования липидных везикул [13, 14]. Эти методы дают возможность получать липосомы разного размера, состава, структуры и внутреннего объема. Так как проникающие свойства липосом, образующихся из фосфолипидов в водной среде, в значительной степени зависят от способа их получения, представляет значительный интерес оценить различные методы по проценту включения лекарственных или биологически активных препаратов во внутренний объем везикул.

Липосомы получали методами этанольной инъекции, выпаривания в обращенной фазе, ручного встряхивания и озвучивания ультразвуком. Все серии изготовленных препаратов проходили электронно-микроскопический контроль. В качестве модельного материала для включения использовали раствор стрептомицина сульфата с концентрацией 125 мг/мл. Характеристика липосомальных препаратов стрептомицина

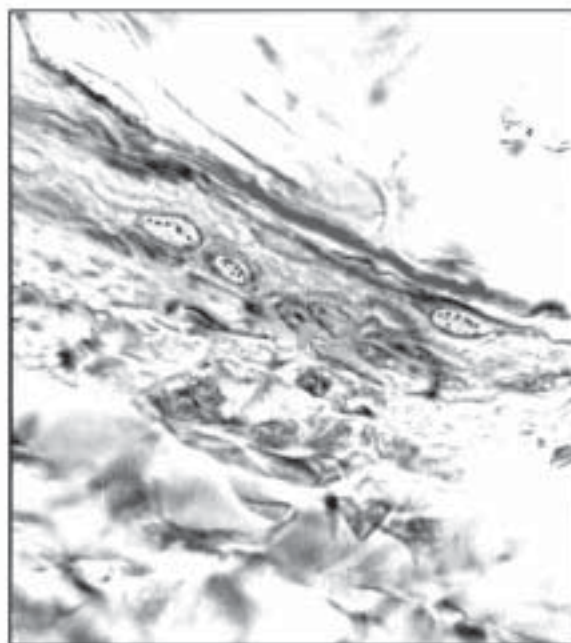


Рис. 3. Участок кожи морских свинок при окрашивании кислотным красителем в липосомальной форме при увеличении 7×90

Т а б л и ц а 2

Характеристика липосомальных препаратов стрептомицина сульфата, полученных различными методами

Метод получения липосом	Удельный внутренний объем, л/моль липидов ($M \pm m$)	Количество препарата в липосомах, г/моль липидов ($M \pm m$)	Уровень включения, % ($M \pm m$)
Обращение фаз	9 \pm 0,5	50 \pm 0,5	78,5 \pm 0,5
Озвучивание МЛВ	0,1 \pm 0,06	0,05 \pm 0,01	0,8 \pm 0,05
Инъекция	1,8 \pm 0,08	1,7 \pm 0,02	8,8 \pm 0,2
Ручное встряхивание	4,5 \pm 0,5	2,5 \pm 0,2	20 \pm 0,5

сульфата, полученных разными методами, дана в табл. 2.

Таким образом, метод обращения фаз обеспечивает максимальный процент включения лекарственного препарата во внутренний объем липосом. Полученные этим методом липидные везикулы имеют внутренний объем 9 л на моль липидов и уровень включения водной фазы 78,5 \pm 2,5%. Результаты электронно-микроскопического исследования липосомальных эмульсий, полученных вышеперечисленными методами, представлены в табл. 3.

Т а б л и ц а 3

Электронно-микроскопическая характеристика липосом, полученных различными методами

Метод получения липосом	Характер везикул	Размер липосом, нм
Обращение фаз	БМВ (80 %)	150–950
	МЛВ (20 %)	100–750
Озвучивание УЗ	ММВ	8–15
Этанольная инъекция	БМВ	100–800
Ручное встряхивание	МЛВ	250–1900

Примечание. БМВ – большие моноламеллярные везикулы; МЛВ – мультиламеллярные везикулы; ММВ – малые моноламеллярные везикулы.

Из приведенных данных следует, что липосомы, полученные разными методами, были гетерогенными по размеру. Наиболее крупные везикулы получены с помощью метода ручного встряхивания. Липосомы, полученные методами этанольной инъекции и выпариванием в обращенной фазе, также содержали гетерогенные по величине везикулы. Однако в среднем они были приблизительно в 2 раза мельче. Обработанные ультразвуком липосомы были более однородными по размеру и очень мелкими (средний диаметр ~12 нм).

На ультратонких срезах выявлены различия в структуре липосом. В результате этанольной инъекции получены везикулы, представляющие собой бислойные замкнутые кольцевые структуры, квалифицированные нами как БМВ (большие моноламеллярные везикулы). При обработке ультразвуком были получены везикулы малых размеров, представляющие собой кольцевые структуры, квалифицированные как ММВ (малые моноламеллярные везикулы). При выпаривании в обращенной фазе в 80% случаев имели место БМВ, а в 20% случаев липосомы состояли из множества концентрических бислоев неправильной формы, квалифицированные нами как МЛВ (мультиламеллярные везикулы). При использовании метода ручного встряхивания все липосомы имели мультиламеллярную структуру. При этом везикулы по своим размерам значительно превосходили липосомы, сконструированные методом обращения фаз.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что метод выпаривания в обращенной фазе обеспечивает максимальное включение водной фазы в структуру липидных везикул. Данный метод имеет ряд и других преимуществ: он технологичен и дает возможность включать в липосомы как гидрофильные, так и гидрофобные соединения; позволяет включать во внутреннюю оболочку везикул до 80% гидрофильных веществ; позволяет максимально избежать загрязнения липосом посторонней микрофлорой

в процессе их получения, за счет использования хлороформа, являющегося хорошим дезинфицирующим средством. Метод дает возможность частичной автоматизации технологического процесса.

Таким образом, использование при конструировании липосом определенного соотношения растительного и животного сырья позволяет получить для транспорта лекарственных и биологически активных веществ внутрь эпидермиса кожи высокоэффективные липосомальные препараты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Владимиров Ю.А.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
2. *Raschke T., Huschka C., Schmalfus W. et al.* Colloidal Tragersysteme fur die dermal Application, Kosmetische Medizin. I. 2004. P. 34.
3. *Марголина А.А., Эрнандес Е.И., Зайкина О.Э.* Новая косметология. М., 2000.
4. *Овчинников Ю.А.* Биоорганическая химия. М., 1988.
5. *Омельченко А.М., Бовыкин Б.А.* // Вестн. АМН СССР. 1990. № 8. С. 27.
6. *Кузякова Л.М.* Медикаментозное преодоление анатомических и клеточных барьеров с помощью липосом. Ставрополь, 2000.
7. *Посте Д.* Взаимодействие липидных везикул (липосом) с клетками в культуре и их использование как переносчиков лекарств и макромолекул. М., 1983. С. 107.
8. *Саатов Т.С., Исаев Э.И., Бурханов С.А.* Аутологичные липосомы // Вестн. АМН СССР. 1990. № 8. С. 47.
9. *Ефременко В.И.* Липосомы (получение, свойства, аспекты применения в биологии и медицине) // Деп. в ВИНТИ РАН 18.12.98., № 3733 – В98. Ставрополь, 1998.
10. *Кобринский Г.Д.* Липосомы – транспортеры лекарств. М., 1989.
11. *Андреева И.Н.* Матер. межд. конф., посвященной 75-летию ректора ХФИ, доктора фармацевтических наук Д.П. Сала. Харьков, 1988. С. 25.
12. *Волкова О.В., Елецкий Ю.К.* Основы гистологии и гистологической техники. М., 1982.
13. *Bermudez M., Martinez S., Mora M.* // I. Liposome Res. 1996. 6. N 1. P. 221.
14. *Medda S. Das N., Mahato S.B.* // Indian I. Biochemist and Biophysics. 1995. 32. N 3. P. 147.

Поступила в редакцию 25.10.04