Марія НЕЧИПОРЕНКО, студентка,
Анна ПРОСВЄТОВА, студентка
Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», м. Київ, Україна, e-mail: nechyporenko.marica@gmail.com, prosvetovaanna53@gmail.com

МАТЕРІАЛИ МЕМБРАН ТЕРМОЧУТЛИВИХ ЛІПОСОМ ДЛЯ КОНТРОЛЬОВАНОЇ ДОСТАВКИ ТА ВИВІЛЬНЕННЯ ПРОТИПУХЛИННИХ ПРЕПАРАТІВ

Анотація. Ліпосоми є одними із найпоширеніших наносистем доставки протипухлинних препаратів, адже збільшують їх ефективність та зменшують шкідливий вплив на організм, а здатність реагувати на зміни температури може зробити інкапсульований в них препарат більш біодоступним, його дію ще більш локалізованою та легше контрольованою. Матеріали мембран ліпосом мають чи не найважливішу роль у забезпеченні термочутливості цих нанокомплексів, тож у цій роботі було розглянуто основні з них, описано вплив, який вони вчиняють на такі властивості ліпосом, як період напіврозпаду, стабільність, швидкість захоплення ретикулоендотеліальною системою, швидкість, повнота та легкість вивільнення препарату тощо, а також показано, як проблеми функціональності наночастинок можуть вирішуватися зміною їх хімічного складу. Робота проводилась на основі аналізу вітчизняних та зарубіжних наукових праць, у яких наведенні дослідження щодо тенденцій, сучасного стану та перспектив застосування термочутливих ліпосом у терапії раку.

Ключові слова: термочутлива ліпосома, система доставки ліків, наномедицина, гіпертермія, біоматеріали.

Актуальність. Одним із найбільш перспективних підходів до підвищення ефективності лікарських засобів є розробка методів їх контрольованої доставки до клітин-мішеней, а також вдосконалення механізмів їх контрольованого вивільнення. Концепція використання для цього мікроскопічних везикул почала активно досліджуватися і розвиватися з 1960-х років після відкриття Алеком Д. Бенгамом ліпосом [1]. Одним із важливих її вдосконалень є ідея використовувати везикули, які б реагували на зміну температури. Чи не найважливішим чинником термочутливості ліпосом, і, як наслідок, їх ефективності, є матеріали їх мембран.

Мета. Дана робота сфокусована на розгляді впливу матеріалів мембран термочутливих ліпосом для контрольованої доставки та вивільнення ліків на їх властивості, ефективність та доцільність застосування у терапії, зокрема протипухлинній.

Основні матеріали. Ліпосоми – це сферичні везикули, утворені подвійним шаром зазвичай фосфоліпідної мембрани, який оточує водне ядро, що можна використовувати для інкапсуляції лікарських засобів [2]. Ліпосоми, що мають медичне використання, мають діаметр від 50 до 450 нм [1]. У водному розчині диспергровані фосфоліпіди через свою амфіфільність прагнуть до формування ліпідних шарів, що стабілізуються гідрофобними та Ван-дер-Ваальсовими взаємодіями, а також водневими зв'язками і полярними взаємодіями між молекулами води і полярними головками фосфоліпідів [1]. Молекули, що присутні під час формування цих шарів, інкапсулюються всередині мембран ліпосом.

Ліпосоми є зручною системою доставки ліків через їх морфологічну подібність до клітинних мембран, можливість модифікації їх біофізичних характеристик (розмір, поверхневий заряд, текучість мембрани і т. д.) ліпідним складом (наприклад, додавання холестерину до ліпідного бішару знижує проникність ліпосом і підвищує їх стабільність [1]) чи методом приготування, а також завдяки їх біосумісності [2]. Ліпосоми запобігають завчасному метаболізму інкапсульованого препарату, зменшують його вплив на здорові тканини, мінімізуючи доставку до них, збільшують період напіврозпаду [1], а також мають тенденцію до накопичення в пухлинах завдяки ефекту підвищеної проникності та утримання [3], що робить їх перспективним і одним із небагатьох схвалених для клінічного застосування способів контрольованої доставки протипухлинних препаратів за допомогою наночастинок [4].

Однак ліпосоми мають суттєвий недолік, який полягає в їх швидкому захопленні ретикулоендотеліальною системою та накопиченні у печінці й селезінці [1]. Для подолання цієї проблеми було розроблено пегільовані ліпосоми (з фрагментами поліетиленгліколя у мембранах), які невидимі для макрофагів через наявність захисної гідрофільної плівки на поверхні [1], мають покращені стабільність і час циркуляції, адже поліетиленгліколь здатен стерично інгібувати електростатичні та гідрофобні взаємодії з компонентами крові [2], а також пасивну орієнтацію на пухлинні тканини [5], що загалом покращує накопичення ліків у місці пухлини. Проте такий підхід теж наштовхується на низку перешкод, адже ПЕГ-покриття може негативно впливати на поглинання ліпосом клітинами-мішенями [1], вони після потрапляння в клітину можуть в направлятися відразу до лізосом [2], а інкапсульований препарат вивільняється настільки ж повільно, як і у випадку звичайних ліпосом [1], тобто доступність ліків після введення в пухлину залишається обмеженою порівняно з вільним перепаратом [4].

Для подолання вище зазначених перепон було розроблено ліпосоми, що реагують на різноманітні стимули: pH, підвищену температуру, ультразвук тощо [1]. Застосування термочутливих ліпосом у поєднанні з локальним нагріванням застосовується для специфічного вивільнення ліків у солідних пухлинах [6]. Це підвищує глибину проникнення препарату в тканину, дозволяє контролювати його вивільнення в просторі та часі, що у свою чергу дає можливість забезпечити безперервне надходження препарату до клітин-мішеней, що важливо, наприклад, для гемцитабіну [2], і дозволяє призвести до тимчасового стрибка локальної концентрації препарату та, як наслідок, підвищення його терапевтичної ефективності [7].

Принцип термочутливих ліпосом такий. За температури плавлення $T_{пл}$ ліпідний бішар переходить із фази твердого гелю до рідкокристалічної фази, в якій проникність мембрани для гідрофільних речовин більша, і є максимальною за температури близько $T_{пл}$ через співіснування обох фаз [2]. Отже, за температури тіла і присутності компонентів крові термочутлива ліпосома повинна стабільно утримувати препарат, а поблизу $T_{пл}$ швидко вивільняти інкапсульовану речовину [2].

Ключовим компонентом мембран термочутливих ліпосом є дипальмітоїл-фосфатидилхолін (DPPC), фазовий перехід якого відбувається за температури 41 °C [1]. Небажаний витік препарату за температури тіла зменшується шляхом додавання невеликої кількості інших фосфоліпідів (наприклад, дистеароїлфосфатидилхоліну (DSPC) з $T_{пл}$=54,9 °C) [2]. Саме такий склад мала перша термочутлива ліпосома, запропонована у 1978 р. Ятвіним та іншими [8]. Для створення стеричного бар'єру для пригнічення поглинання ретикулоендотеліальною системою та збільшення часу циркуляції в мембрани вбудовуються сурфактанти (наприклад, поліетиленгліколь (ПЕГ) з прищепленим ліпідом) [2]. Загалом очевидно, що $T_{пл}$ мембрани визначає її склад, однак на вивільнення ліків також впливає розмір везикули, інкапсульована речовина та компоненти зовнішнього середовища [2].

Традиційні термочутливі ліпосоми (TTSL) з мембраною із DPPC, L-α-фосфатидилхоліну (HSPC), холестерину та DPPE-PEG (фосфоліпідний кон'югат ПЕГ) за температури 42 °C вивільнили 60 % свого вмісту за 30 хв знаходження у людській плазмі, при цьому різниця між зовнішньою концентрацією препарату (у даному випадку доксорубіцину) за температури 34°C та після нагрівання протягом однієї години до 42 °C становила 38 разів [2], що свідчить про високу стабільність композиції, яка досягалась пегілюванням і наявністю холестерину в складі мембрани [2]. Основним недоліком препаратів на основі TTSL є відносно повільне та неповне вивільнення лікарського засобу при температурах вище температури переходу [4].

Включення лізоліпідів (зокрема, S-лізо-PC) призводить до утворення пор у ліпідному бішарі при нагріванні до температури ліпідного переходу [4], що збільшує швидкість вивільнення доксорубіцину до 80 % за 20 секунд при 41,3 °C [3]. Такі ліпосоми називають низькотемпературними (LTSL), і на їх основі було розроблено препарат ThermoDox® з

діючою речовиною доксорубіцином [4]. Щоб забезпечити різку температуру переходу, холестерин не був включений до його складу; недоліком цієї мембрани також є відносно короткий час циркуляції, через що гіпертермія зазвичай застосовується до або відразу після введення препарату, і він вводиться внутрішньосудинно в ділянці пухлини [4]. Це дозволяє подолати залежність від ефекту ЕПР для пасивного таргетування ліпосом до солідних пухлинних ділянок і забезпечує вільне проникнення препарату через інтерстицій пухлини [4].

Для збільшення періоду напіврозпаду везикул було розроблено молекулярний клас олігогліцеролів [2], які можуть включатися до складу мембран ліпосом у доволі великих об’ємах (до 70 % загальної кількості речовини мембрани [2]). Одна із речовин цього класу – $DPPG_2$, що є синтетичним фосфоліпідом – поряд із DPPC та DSPC формує мембрани $DPPG_2$-термочутливих ліпосом, які не потребують включення поверхнево-активних речовин, при цьому зберігаючи таку ж швидкість вивільнення препаратів, як і LTSL-ліпосоми, але $T_{пл}$ у них на градус вища (порядку 42 °C) [2]. При застосуванні гемцитабіну $DPPG_2$-TSL було виявлено значну затримку росту пухлини порівняно з іншими препаратами гемцитабіну, включаючи гемцитабін, інкапсульований у $DPPG_2$-термочутливу ліпосому без гіпертермії [9].

Стерично стабілізована композиція TSL (Stealth TSL) була розроблена на основі оригінальної композиції Ятвіна додаванням DSPE-PEG_{2000} для покращення стабільності та кращого періоду напіввиведення порівняно з LTSL [2]. Stealth TSL мають кращу стабільність in vitro при 37 °C у сироватці порівняно з LTSL, але температура початку і максимального вивільнення (42 °C) доксорубіцину з них також вищі [2]. Через відсутність лізо-PC у Stealth TSL швидкість вивільнення доксорубіцину при 42°C нижча порівняно з LTSL [2].

Ще один підхід для підвищення чутливості ліпосом до температури (чи надання її нетермочутливим композиціям) полягає у включенні до їх складу синтетичних полімерів, які руйнують мембрану у відповідь на нагрівання [3]. Їх специфіка полягає в тому, що при нижній критичній температурі розчину (LCST) вони здійснюють різкий перехід зі спіралі в глобулу, тому коли чутливі до температури полімери приєднуються до ліпосом, фазовий перехід руйнує мембрану (рис. 1), сприяючи вивільненню ліків поблизу LCST, яка у свою чергу залежить від здатності мономерних одиниць полімеру утворювати водневі зв’язки, і теоретично може бути налаштована до бажаних діапазонів зміною вмісту гідрофільного або гідрофобного мономеру [3].

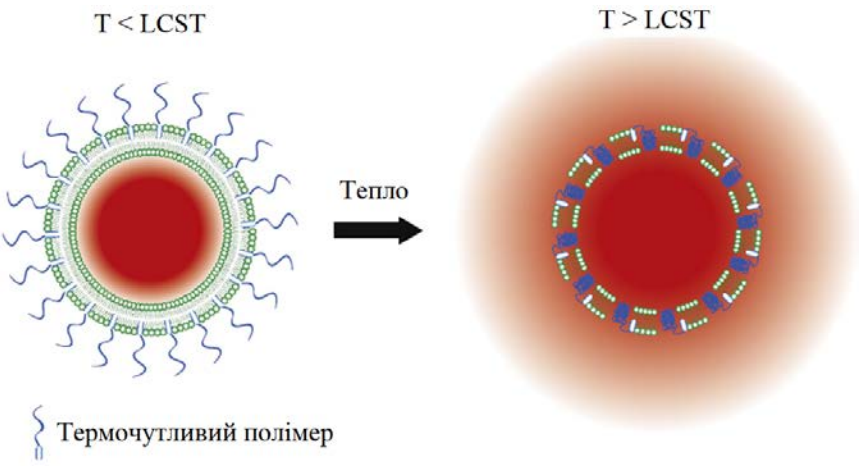

Рис. 1. Вивільнення ліків з полімер-модифікованої термочутливої ліпосоми [3]

Полі(N-заміщені акриламіди) є найбільш вивченим класом чутливих до температури полімерів [3]. У перших дослідженнях використовувалися полімери з LCST нижчими фізіологічної температури (наприклад, N-ізопропілакриламід (NIPAAm), кополімеризований з гідрофобними мономерами [10]), тобто не були клінічно практичними, проте виявили посилене вивільнення препаратів з ліпосом за температур, вищих за LCST полімеру, і мінімальне вивільнення за нижчих, що дозволило зробити висновки про доцільність

закріплення чутливих до температури полімерів на ліпідних мембранах для надання ліпосомам властивості чутливого до температури вивільнення [3].

Пізніше було продемонстровано, що вільнорадикальна кополімеризація N-ізопропілакриламіду з різними молярними концентраціями гідрофільного акриламіду дозволяє налаштувати LCST, при цьому, що вища концентрація акриламіду (AAm), то вищою є LCST [3]. Непегільовані початково нетермочутливі ліпосоми з яєчного фосфохоліну, які були модифіковані N-ізопропілакриламідом, кополімеризованим акриламідом (p(NIPAAm-co-AAm)), показали підвищення $T_{пл}$ зі збільшенням частки AAm [3]. Отже, налаштуванням LCST можна регулювати температури, за яких вивільняються препарати з ліпосом.

Однак важливим є також розуміння факторів, що визначають кінцеву кількість вивільненого препарату, а не тільки температуру цього вивільнення. Виявилося, що ефективність і швидкість вивільнення інкапсульованого препарату залежить від способу закріплення ланцюгів полімера на мембрані ліпосоми – ліпосоми з ланцюгами, прикріпленими за кінець, показували кращі результати, ніж ті, де ланцюги було прикріплено у кількох місцях [3]. Також вплив на ступінь вивільнення препаратів і $T_{пл}$ мають безпосередньо кополімери. Так, навіть якщо LCST різних полімерів однакова, кополімери N-ізопропілакриламіду, що входять до складу кожного з них, будуть по-різному впливати на взаємодію полімера з мембраною, що і спричиняє відмінності у властивостях ліпосом [3].

Одним із основних недоліків полі(N-заміщених акриламідів) є те, що вони не піддаються біологічному розкладанню [3]. Як альтернатива, вивчаються біорозкладані кополімери на основі N-(2-гідроксипропіл)метакриламіду (HPMA), що можуть мати регульовану LCST в діапазоні від 13 до 65°C і вже додаються до нетермочутливих ліпосом і ліпосом з DPPC [3].

Ще однією альтернативою N-заміщеним акриламідам є полі(N-вінілові ефіри), які мають схожий механізм термочутливості і LCST, які можна налаштувати шляхом кополімеризації з гідрофобними мономерами, при цьому довжина ланцюга позитивно впливає на інтенсивність вивільнення ліків [3]. Ліпосоми з яєчного фосфохоліну, модифіковані кополімерами цієї групи вже мають позитивні результати у дослідженнях in vivo [11].

Полоксамери (торгова назва Pluronics ®) є групою триблок-кополімерів (гідрофобне ядро з поліпропіленоксиду (PPO), та гідрофільні кінцеві блоки з поліетиленоксиду (PEO)) [12] і мають відмінний від розглянутого вище термочутливий механізм. У водному середовищі за температур, нижчих їх критичної міцелярної температури (CMT), полоксамери залишаються у вигляді індивідуальних неасоційованих кополімерів, а вище CMT стають більш гідрофобними та утворюють міцели з гідрофобними групами PPO, що утворюють міцелярне ядро. Цю поведінку можна використовувати для надання термочутливості ліпосомам [3]. Зміна довжини гідрофільних і гідрофобних блоків змінює загальну молекулярну масу і кінцеві властивості полоксамера, в т. ч. його CMT [12]. Однак, дослідження полоксамера Pluronic F-127 показали, що навіть при низьких його концентраціях ($T_{пл}$ ліпосоми знижується зі збільшенням концентрації плоксамера) $T_{пл}$ ліпосоми є занадто низькою для клінічного застосування (32...34 °C), і лише за інкапсулювання препарату великою молекулярною масою сягає 38...42 °C [3].

Одним із способів удосконалення доставки ліків до клітин-мішеней є магнітне таргетування. Справа в тому, що магнітні поля проходять через біологічні тканини без поглинання і перешкод, і як наслідок магніточутливі частинки, яким передається енергія зовнішнього магнітного поля можуть бути використані для терапії і доставки ліків з високою локальною точністю, особливо при раку [7]. Найбільш поширеними є два підходи: використання магнітних частинок для покращення накопичення ліків у потрібному регіоні за допомогою магнітного таргетування; та використання магнітних полів для нагрівання магнітних частинок з метою безпосередньої індукції гіпертермії або абляції хворих тканин та/або для вивільнення ліків з термочутливих носіїв [7].

Одними з найбільш часто використовуваних магнітних частинок для доставки ліків є суперпарамагнітні наночастинки оксиду заліза (SPION) [7]. Як парамагнітні матеріали, вони намагнічуються лише в прикладеному полі, а через невеликі розмір і кількість доменів демонструють значно вищу магнітну сприйнятливість, ніж парамагнетики [7]. Властивості кінцевих частинок залежать від багатьох факторів: розміру, що пропорційний магнітному моменту, легуючих добавок (зокрема, марганець і цинк допомагають підвищити питомий коефіцієнт поглинання електромагнітної енергії (SAR), що покращує нагрівання [13]), методу синтезу і навіть форми.

За магнітного таргетування, ліки і магнітні наночастинки інкапсулюються в наноносій, а сильний зовнішній магніт використовується для накопичення носія лікарського засобу в мішені поблизу магніту. Основна проблема полягає в тому, що магнітні градієнти швидко спадають із віддаленням від поверхні магніту, і тому магнітне таргетування працює лише на поверхневі пухлини (5-18 мм в залежності від розміру і матеріалу частинки) [7], щоправда ситуацію можна частково виправити використанням наноносіїв з багатьма магнітними наночастинками [7].

Як тільки магнітні носії ліків накопичуються в пухлині, зовнішнє змінне магнітне поле (ЗМП) можна поєднати зі SPION для генерації тепла [7]. У присутності ЗМП SPION постійно вирівнюють свій магнітний момент з напрямком поля, розсіюючи енергію у вигляді тепла, і якщо поле змінюється швидко, вони виділяють достатньо тепла, щоб змінити свою локальну температуру [7]. Це тепло можна використовувати для індукції загибелі пухлинних клітин за допомогою гіпертермії або абляції, а також індукування вивільнення протипухлинних препаратів з термочутливих наноносіїв [7]. Тоді як для ефективної гіпертермії та абляції потрібні надзвичайно високі концентрації SPION [14], вивільнення ліків не стикається з цією проблемою, адже наночастинки здатні генерувати надзвичайно локалізоване нагрівання, практично не впливаючи на глобальну температуру [7].

Для спільної доставки ліків і SPION було розроблено магнітоліпосоми [7]. Наприклад, одна із таких є термочутливою ліпосомою на основі DPPC з магнітними частинками, вбудованими у ліпідну мембрану, і здатна поєднувати візуалізацію, магнітне таргетування та магнітно-спровоковане вивільнення ліків (доксорубіцину) [15]. Також існують ліпосоми, в які магнітні наночастинки інкапсульовано [7].

Висновки

Ліпосоми – ліпідні нановезикули, що широко застосовуються як системи доставки ліків у терапії раку через їх біосумісність, контрольованість властивостей, здатність зменшувати шкідливий вплив препаратів на здорові тканини та водночас підвищувати їх терапевтичну ефективність. Для специфічного і швидкого вивільнення ліків у пухлинах та одночасної стабільності поза ними було розроблено термочутливі ліпосоми, ліпідний бішар мембран яких за певної температури здійснює фазовий перехід, сприяючи вивільненню інкапсульованого препарату з везикули. Температуру фазового переходу, стабільність, швидкість вивільнення препарату, час циркуляції ліпосоми кровообігом можна змінювати, модифікуючи склад її мембрани.

Базовим компонентом термочутливих мембран є DPPC, який за фізіологічних температур стабілізується за допомогою DSPC. Стабільність цієї композиції можна досягнути додаванням холестерину та пегілюванням, однак це повпливає на швидкість і повноту вивільнення. Включення лізоліпідів дозволяє суттєво зменшити температуру фазового переходу, але негативно впливає на час циркуляції. Для уникнення додавання поверхневоактивних речовини (зокрема, ПЕГ), збереження швидкості вивільнення та збільшення періоду напіврозпаду до ліпосом включають олігогліцероли.

Для підвищення термочутливості чи надання її ліпосомам з нетермочутливих матеріалів до їх складу включають синтетичні термочутливі полімери, фазовий перехід яких руйнує мембрану. Було помічено залежність $T_{пл}$ таких ліпосом від LCST полімерів, при яких вони переходять зі спіралі в глобулу, способу їх прикріплення до мембрани, довжини, складу

кополімерів тощо. LCST можна змінювати, модифікуючи склад полімеру. Триблокові кополімери полоксамери, принцип впливу яких відрізняється від заснованого на LCST, за критичної міцелярної температурири з неасоційованих кополімерів перетворюються на міцели, і таким чином надіють ліпосомам термочутливість. Такі композиції підходять дл інкапсулювання препаратів з великою молекулярною масою.

Магнітні наночастинки типу SPION, властивості яких регулюються складом, формою, способом приготування, можна включати до складу термочутливого мембран ліпосом чи інкапсулювати всередині для застосування магнітного таргетування та дуже локалізованого нагріву, індукованого магнітним полем, щоб зменшити негативний вплив зовнішнього нагрівання.

Література

1. Bozzuto G., Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. International journal of nanomedicine. 2015. P. 975.

2. Thermosensitive liposomal drug delivery systems: state of the art review / M. Hossann et al. International journal of nanomedicine. 2014. P. 4387.

3. Ta T., Porter T. M. Thermosensitive liposomes for localized delivery and triggered release of chemotherapy. Journal of controlled release. 2013. Vol. 169, no. 1-2. P. 112–125.

4. Dou Y., Hynynen K., Allen C. To heat or not to heat: challenges with clinical translation of thermosensitive liposomes. Journal of controlled release. 2017. Vol. 249. P. 63–73.

5. Синтез і дослідження антибактеріальної активності пегільованих енрофлоксацинів / І. А. Дронь та ін. Вісник Національного університету «Львівська політехніка». Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування». 2018. № 886. С. 47–51.

6. The application of thermosensitive nanocarriers in controlled drug delivery / P. Shao et al. Journal of nanomaterials. 2011. Vol. 2011. P. 1–12.

7. Use of magnetic fields and nanoparticles to trigger drug release and improve tumor targeting / J. F. Liu et al. Wiley interdisciplinary reviews: nanomedicine and nanobiotechnology. 2019. Vol. 11, no. 6.

8. Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia / M. Yatvin et al. *Science*. 1978. Vol. 202, no. 4374. P. 1290–1293.

9. Gemcitabine treatment of rat soft tissue sarcoma with phosphatidyldiglycerol-based thermosensitive liposomes / S. Limmer et al. Pharmaceutical research. 2014. Vol. 31, no. 9. P. 2276–2286.

10. Kono K., Hayashi H., Takagishi T. Temperature-sensitive liposomes: liposomes bearing poly (N-isopropylacrylamide). Journal of controlled release. 1994. Vol. 30, no. 1. P. 69–75.

11. Highly temperature-sensitive liposomes based on a thermosensitive block copolymer for tumor-specific chemotherapy / K. Kono et al. Biomaterials. 2010. Vol. 31, no. 27. P. 7096–7105.

12. Poloxamer: a versatile tri-block copolymer for biomedical applications / P. Zarrintaj et al. Acta biomaterialia. 2020. Vol. 110. P. 37–67.

13. Critical enhancements of MRI contrast and hyperthermic effects by dopant-controlled magnetic nanoparticles / J.-t. Jang et al. Angewandte chemie international edition. 2009. Vol. 48, no. 7. P. 1234–1238.

14. Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles / S. Laurent et al. Advances in colloid and interface science. 2011. Vol. 166, no. 1-2. P. 8–23.

15. Light/magnetic hyperthermia triggered drug released from multi-functional thermo-sensitive magnetoliposomes for precise cancer synergetic theranostics / Y. Guo et al. Journal of controlled release. 2018. Vol. 272. P. 145–158.