УДК 612.13:612.273.2 https://doi.org/10.33250/14.04.272

А. И. Соловьев, А. С. Хромов

От «пустой» липосомы до сложной наноструктуры

Государственное учреждение «Институт фармакологии и токсикологии Национальной академии медицинских наук Украины», г. Киев

Ключевые слова: липосомы, наноструктуры

Вступление

Относительно недавно международная группа ученых в составе B. S. Pattni, V. V. Chupin, V. P. Torchilin (2015 г.) на страницах журнала Chemical Review подвела итоги многолетнего изучения удивительных образований – липосом – микроскопических капсул (везикул) [1], которые в настоящее время широко используются для создания лекарств во всем мире. Авторам статьи посчастливилось принимать активное участие в этом процессе практически с самого начала. Удивительное сочетание чутья ученого и организатора в очередной раз не подвело нашего друга и коллегу, а затем и директора Института фармакологии и токсикологии НАМНУ А. В. Стефанова – направление исследований было выбрано им безошибочно, интересное и многообещающее.

Не вызывает сомнения тезис о том, что большинство заболеваний поражает не весь организм, а отдельные органы и ткани (хотя, конечно, это не проходит бесследно для других органов и систем). Следовательно, лечение будет более быстрым и успешным в том случае, если лекарства будут доставляться непосредственно в очаг заболевания, то есть, действовать таргетно. Особенно это важно в тех случаях, когда приходится иметь дело с довольно токсичными препаратами, которые хорошо лечат саму болезнь, но при этом плохо влияют на другие системы организма. Так бывает, например, при лечении онкологических заболеваний.

Создание нужной концентрации лекарственных веществ в пораженных болезнью местах (то есть, обеспечение критически важной локальной биодоступности препарата), не затрагивая при этом не вовлеченные в патологический процесс органы и ткани, – задача непростая. Ведь медикаменты, каким бы способом их ни вводили, попадают в кровь и расходятся по всему организму более или менее равномерно. А для того, чтобы они попали в нужные места («мишени»), необходим какой-то носитель, который мог бы их туда доставить в достаточном количестве. За последние несколько лет предпринято множество попыток решить эту проблему, перепробовано множество соединений и оказалось, что лучшими переносчиками лекарств являются именно липосомы.

Какие же качества липосом дают им преимущества перед другими носителями лекарств? Прежде всего, это сродство с природными мембранами клеток по химическому составу. Известно, что липиды, входящие в состав мембран, занимают от 20 до 80 процентов их массы. Поэтому при правильном подборе компонентов липосом их введение в организм не вызывает негативных реакций.

Второе важное свойство липосом – это универсальность. Благодаря полусинтетической природе можно широко варьировать их размеры, характеристики, состав поверхности. Это позволяет «поручать» липосомам переносить широкий круг фармакологически активных веществ: противоопухолевые и противомикробные препараты, гормоны, ферменты, вакцины, а также дополнительные источники энергии для клетки, генетический материал.

В-третьих, липосомы сравнительно легко распадаются в организме (биодеградация), высвобождая доставленные вещества, но в пути следования липосомы, сами лишенные свойств антигена,

© Колектив авторів, 2020

надежно укрывают свой груз от контакта с иммунной системой и, стало быть, не вызывают защитных и аллергических реакций организма.

Важную роль играет также характер взаимодействия липосом с клетками. Взаимодействие может принимать разные формы: самая простая – липосомы адсорбируются (прикрепляются) на клеточной поверхности. Дело на этом может закончиться, а может пойти дальше: липосому поглотит клетка (этот процесс «заглатывания» называется эндоцитоз), и вместе с ней внутрь клетки попадут те вещества, которые она доставила. Наконец, липосомы могут слиться с мембранами клеток и стать их частью. При этом могут изменяться свойства клеточных мембран, например: вязкость и проницаемость; величина электрического заряда; фосфолипидное окружение ферментов и ионных каналов и, соответственно, их активность; изменения количества каналов, встроенных в мембраны (вот почему даже так называемая пустая липосома может быть биологически активным агентом!).

Таким образом, благодаря липосомам появляется новый способ направленного воздействия на клетку, который можно назвать «мембранной инженерией» [2], то есть, появляется возможность модифицировать клеточную мембрану в заданном направлении.

Исторический экскурс

«Empty liposomes? It's unbelievable!» Примерно так, одинаково экзальтированно, отреагировали два нобелевских лауреата, сэр Robert Furchgott и сэр John Vane на сообщение, что так называемые «пустые» (то есть, не несущие в своей внутренней полости или мембране активных субстанций) липосомы обладают способностью восстанавливать сократимость и эндотелий-зависимое расслабление в сосудах крыс в условиях гипоксии, при воздействии ионизирующей радиации или развитии артериальной гипертензии.

Первые опыты с липосомами начались, когда А. В. Стефанов еще был сотрудником Института физиологии им. А. А. Богомольца НАНУ в лаборатории академика В. К. Лишко. И первая наша совместная работа была посвящена влиянию липосом различного состава на электрическую и сократительную активность сосудистых гладких мышц и была опубликована в Докладах АН СССР (тогда это было круто!) с рекомендацией великого П. Г. (академика Платона Григорьевича Костюка). Но тогда мне (А. И. Соловьеву) эти исследования еще не казались особенно интересными, просто было любопытно.

Интенсивная работа в этом направлении началась, когда А. В. Стефанов возглавил лабораторию липосом в Институте биохимии им. А. В. Палладина НАНУ. Запомнилось, что однажды зимой еще совсем юный ученый Саша (теперь Александр Викторович) Паршиков принес, согревая за пазухой, свежеприготовленные фосфатидилхолиновые липосомы (ФХЛ) в Институт физиологии им. А. А. Богомольца, где тогда работал один из авторов этой статьи. Стефанова тогда интересовало, как влияют (и влияют ли вообще) липосомы на ионную проницаемость мембран гладкомышечных клеток (ГМК). На этот вопрос мы, как могли, попытались ответить. А потом начались чудеса.

В то время мы были заняты идентификацией сенсоров кислорода (то есть,

Р. Фарчгот (справа) и А. И. Соловьев на I Международной конференции по биологической химии и терапевтическому применению оксида азота (I International Conference of Biological Chemistry and Therapeutic Application of Nitric Oxide, June 3–7, 2000, San Francisco, USA)

субклеточных структур, ответственных за рецепцию изменений p_{O_2} в окружающей среде и реализацию сократительного ответа) в ГМК сосудов. Как известно, ГМК сосудов большого круга при гипоксии расслабляются. Однако клеточные механизмы этого явления были не известны. Ситуацию запутывало еще и то, что ГМК сосудов малого круга в ответ на снижение оксигенации, напротив, сокращаются. Поработав с липосомами, мы вернулись к своей тематике. Но не тут-то было. Воротная вена (любимый в то время объект исследования) упорно отказывалась реагировать на снижение оксигенации буферного раствора. Приборы показывали, что напряжение кислорода в ванночке падает до 5–7 мм рт. ст., а авторитмическая активность гладких мышц практически не изменяется. Не будем утомлять читателя деталями, скажем только что «виновниками» оказались липосомы, адсорбированные на внутренней поверхности трубок системы перфузии.

Так было открыто удивительное явление – антигипоксический эффект «пустых» липосом. Сразу скажем, что вообще-то «пустых» липосом не бывает. Липосомы замыкались в пузырек в определенной среде. Тогда это был хлорид натрия. Но хлорид натрия не способен помочь клеткам в их противостоянии гипоксии. Тут надо снова отдать должное организационному таланту А. В. Стефанова – он мгновенно понял важность этого явления, и интервью с нами попало в ведущую программу украинского телевидения.

А. В. Стефанов (справа) и А. И. Соловьев на XIII Международном конгрессе по фармакологии (XIII International Congress of Pharmacology, 26–31 July, 1998, Munich, Germany)

С тех пор прошло много лет, но только сейчас мы, наконец, приблизились к пониманию этого феномена. Потребовалось новое оборудование, освоение новых методик. Итак, оказалось, что липосомы не просто переносчики лекарств, они еще обладают и собственной биологической активностью. Тем не менее, это не умаляет их роли как переносчиков лекарств, а, напротив, делает их для этой цели еще более привлекательными.

Почему же липосомы так нужны при лечении основных заболеваний человека

На состояние здоровья населения Украины, как и большинства стран европейского региона, определяющее влияние оказывают болезни системы кровообращения, сахарный диабет, злокачественные новообразования, обструктивные болезни легких. Но особое место занимают именно болезни системы кровообращения (прежде всего, гипертоническая болезнь), от которых ежегодно в Европе умирает больше 4 млн человек, в Украине – около 500 тыс., и которые являются ведущей причиной заболеваемости, инвалидизации и смертности населения в нашей стране.

Острая необходимость поиска новых путей терапии заболеваний сердца и сосудов обусловлена еще и тем, что традиционная терапия (нитраты, β-адреноблокаторы, блокаторы кальциевых каналов, ингибиторы АПФ и др.), которая, безусловно, полезна при заболеваниях легкой и средней тяжести, является относительно малоэффективной при тяжелых случаях заболевания сердца и, особенно, обширных инфарктах миокарда, осложненных кардиогенным шоком, и при инсультах. Кроме того, для использования этих препаратов существует множество противопоказаний в виде сопутствующих заболеваний или осложнений. Да и сами по себе они

обладают целым букетом различных побочных эффектов [3, 4].

Одним из общих фундаментальных механизмов развития различных заболеваний сердца и, в частности, важнейшим фактором патогенеза острого инфаркта миокарда и реперфузионного синдрома является нарушение структуры и функции мембран эндотелиоцитов, кардиомиоцитов и других клеток сердца [5]. Следствием этого является деградация фосфолипидов мембран и образование высокоэффективных биологически активных веществ. Особая роль в патогенезе заболеваний сердца принадлежит лейкотриенам, тромбоксанам, лизофосфатидам, тромбоцит-активирующему фактору, гидроперекисям – веществам, которые имеют коронароконстрикторное, аритмогенное, хемоатрактивное и проагрегантное действие. Процессы деградации фосфолипидов сопровождаются образованием ряда промежуточных продуктов, имеющих выраженные прооксидантные свойства. Активация процессов свободно-радикального окисления, как во время самой гипоксии и ишемии, так и особенно в период реоксигенации, приводит к нарушениям функций и повреждению структуры клеточных мембран, изменяют их ионную проводимость. Этот процесс сопровождается увеличением содержания внутриклеточного депонированного кальция. В результате нарушается ионный и энергетический гомеостаз клеток [6].

Сказанное относится не только к плазматическим мембранам, но и к мембранам сарко- (эндо-) плазматического ретикулума, митохондрий и т. д. В том случае, когда такие изменения происходят в сосудистой стенке, возникают еще большие нарушения кровоснабжения соответствующих органов и тканей. Восстановление перфузии ишемизированного миокарда является одним из эффективных путей сохранения жизнедеятельности клеток. При значительной продолжительности ишемии восстановление кровотока усиливает все мембранные повреждения, что связано с еще большей активацией процессов свободно-радикального окисления. При этом развивается феномен no-reflow, что способствует дальнейшему угнетению насосной и сократительной функции сердца.

Эндотелиальная дисфункция является ключевым звеном в патогенезе многих заболеваний, таких как артериальная гипертензия, инсульт, сахарный диабет, метаболический синдром, эректильная дисфункция и почечная недостаточность [7–9]. Дисфункция эндотелия является начальной стадией морфологических изменений при этих заболеваниях [10]. Она особенно часто наблюдается у пациентов с традиционными факторами риска, включающими ожирение, гиперхолестеринемию, сахарный диабет и артериальную гипертензию, часто еще задолго до того, как сами заболевания начинают клинически проявляться [11].

Эндотелиальная дисфункция широко распространена и развивается по мере старения даже при кажущемся отсутствии сосудистых заболеваний [12]. Эндотелиальная дисфункция может рассматриваться как первичное фенотипическое проявление старения у здоровых людей. Считают, что такая первичная сосудистая дисфункция является причиной повышения риска сердечно-сосудистых заболеваний по мере старения. С ней связывают также снижение когнитивных функций и физической активности [13].

Фармакологическая коррекция персистирующей дисфункции эндотелия может существенно снизить риск развития атеросклероза [14]. Терапевтические доноры оксида азота давно и успешно используются в клинической практике. Прежде всего, это связано с тем, что NO является мощным вазодилататором, хотя, к сожалению, и имеет короткий период полураспада. Физиологической активностью обладает не только оксид азота, но и многочисленные продукты его преобразования. Среди них особое место занимают пероксинитрит, нитриты и нитраты, а также нитрозотиолы, гемовые и негемовые нитрозильные комплексы. За исключением пероксинитрита, все они способны при определенных условиях выделять оксид азота в свободном виде, и таким образом, являются депо NO.

Основной путь NO сигнализации, ответственный за сосудистую релаксацию, включает в себя активацию растворимой гуанилатциклазы с последующим накоплением цГМФ и активацией цГМФ-зависимых протеинкиназ. Это, в свою очередь, приводит к активации трансмембранных белков, таких, например, как K^+ каналы и вызывает вазодилатацию за счет активации выходящего калиевого тока, блокады входящего тока кальция и снижения концентрации цитозольного Ca^{2+}.

Фундаментальные исследования последних лет показали, что одним из перспективных путей решения проблемы лечения ишемических и реперфузионных повреждений тканей и органов может явиться применение липосом, терапевтическая эффективность которых показана при ряде патологических процессов [15–17].

С точки зрения биологической совместимости липосомы идеальны в роли переносчиков лекарственных препаратов. Они изготавливаются из природных липидов и поэтому нетоксичны, не вызывают нежелательных иммунных реакций и биодеградируемы. Однако липосомы недостаточно стабильны в крови и быстро выводятся из кровотока макрофагами, которые находятся в печени, селезенке и костном мозге. По этой причине липосомные носители не всегда удается направить именно в те органы и ткани, где происходит патологический процесс. Хотя иногда такие «недостатки» удается использовать в качестве достоинств. Естественная нацеленность макрофагов на липосомы может быть использована для их активации, что очень полезно для борьбы с различными инфекционными заболеваниями. То, что липосомы не накапливаются в интактных тканях некоторых внутренних органов (сердце, почки, мозг), а также клетками нервной системы, позволяет за счет использования липосомальных лекарственных форм значительно снизить кардиотоксичность, нефротоксичность и нейротоксичность противоопухолевых препаратов.

Способность липосом включать в себя самые разные вещества практически без ограничений в отношении их химической природы, свойств и размера молекул предоставляет уникальные возможности для решения различных медицинских проблем. Так, многие лекарственные препараты имеют низкий терапевтический индекс или быстро теряют свою активность под действием инактивирующих агентов. Включение таких препаратов в липосомы может значительно повысить их терапевтическую эффективность, поскольку, с одной стороны, препарат, находящийся в липосоме, защищен ее мембраной от действия неблагоприятных факторов, а с другой стороны, та же мембрана не позволяет токсичному препарату превысить допустимую концентрацию в биологических жидкостях организма.

Первые же попытки использования липосом для коррекции некоторых патологических процессов показали их потенциальную терапевтическую перспективность [18–21].

При изучении механизмов терапевтического действия липосом было обнаружено, что последние способны взаимодействовать с мембранами клеток. Кроме того, работами ряда исследователей, в том числе и нами [22], было показано преимущественное накопление липосом в ишемизированных тканях или на клетках с деполяризованной мембраной [23, 24]. Кроме того, липосомы, благодаря малым размерам и большой суммарной поверхности, способны абсорбировать на себе различные вещества с малой и средней молекулярной массой. Еще одно важное преимущество липосом в качестве носителя – это постепенное высвобождение лекарственной субстанции, что увеличивает время ее действия [25].

Из всей совокупности опубликованных данных изучению самостоятельной физиологической активности липосом посвящено не так уж много работ. Тем не менее, в этих исследованиях была показана выраженная активность «пустых» липосом в организме животных и человека.

Продемонстрирована способность ФХЛ оказывать влияние на электрическую и сократительную активность сосудистых гладких мышц [26]. При гипоксии ФХЛ восстанавливают изме-

ненную для ионов проницаемость плазматических мембран гладких мышц сосудов [27, 28], а у крыс со спонтанной артериальной гипертензией улучшают эндотелий-зависимые дилататорные реакции сосудов [18]. Кроме того, было показано, что «пустые» ФХЛ эффективно восстанавливают вызванное ацетилхолином эндотелий-зависимое расслабление изолированных колец грудной аорты, нарушенное воздействием гамма-облучения, и не влияют на эндотелий-независимые сосудистые реакции, вызываемые терапевтическими донорами оксида азота. Липосомы также восстанавливают пониженную после облучения чувствительность сосудистой ткани к ацетилхолину и оксиду азота [29].

Итак, в экспериментальных исследованиях было продемонстрировано, что липосомы оказывают антигипоксическое, антиоксидантное действие и способствуют сохранению сократительной активности гладких мышц сосудов, поддерживают энергетический метаболизм гипоксигенированных тканей [21, 30, 31].

При изучении влияния ФХЛ на макро- и микроэлементный состав сурфактанта легких у крыс, которым предварительно ингаляционно вводили диоксид серы, было установлено, что применение липосом сопровождается мембранопротекторным действием и нормализацией содержания микро- и макроэлементов в сурфактанте легких у крыс [32]. Практическое подтверждение эффективности применения липосом было получено при клиническом изучении их специфической фармакологической активности в исследованиях с участием пациентов с гнойно-деструктивными заболеваниями легких, осложненными синдромом дыхательной недостаточности [33, 34].

Введение ФХЛ непосредственно перед восстановлением кровотока в коронарной артерии способствовало сохранению насосной и сократительной функции сердца в реперфузионном периоде и приводило к нормализации как центральной гемодинамики, так и коронарного кровотока. Феномен «no-reflow» не развивался. На электрокардиограмме регистрировались лишь единичные экстрасистолы. Концентрации малонового диальдегида и восстановленного глутатиона практически не отличались от своих первоначальных величин [35].

На модели субтотальной ишемии-реперфузии миокарда и в условиях гипоксической гипоксии показана способность ФХЛ практически полностью устранять развитие гипертензии в легочной артерии [35, 36]. Кроме того, в экспериментах на животных были продемонстрированы гипотензивные эффекты ФХЛ при артериальной гипертензии различного генеза [37, 38].

К настоящему времени в условиях эксперимента изучалось как самостоятельное, так и в сочетании с другими лекарственными средствами использование липосом для коррекции геморрагического шока. Введение ФХЛ в инфузионную среду способствует более полноценной коррекции кровопотери. Это проявляется в предупреждении развития лактат-ацидоза и избыточной активации свободно-радикального окисления, нормализации и длительной стабилизации центральной гемодинамики без развития синдрома «централизации кровообращения» [39].

Было показано, что введение липосом предупреждает развитие нарушений микроциркуляции при генерализованной гнойной инфекции [40].

Возможность использования липосом как средства неспецифической детоксикации была продемонстрирована в экспериментах на животных при моделировании синдрома длительного раздавливания, бактериального шока, острой ишемии и реперфузии миокарда. Введение ФХЛ способствовало значительному снижению токсичных свойств крови и нормализации параметров системной гемодинамики [41, 42].

И все же ключевым для липосом являетя противогипоксический эффект. Он может обусловливаться их влиянием на такие физиологические механизмы:

а) в условиях *in vivo* это происходит за счет влияния на диффузию кислорода через биологические барьеры, что приводит к увеличению напряжения

O_2 в крови и тканях. Увеличение потребления кислорода в течение одного дыхательного цикла сопровождается снижением частоты дыхания при постоянном минутном объеме вентиляции и ограничивает развитие гипоксии тканей;

б) ограничение избыточного образования молочной кислоты и ее аккумуляции в тканях;

в) восстановление продукции основных энергетических субстратов в тканях, механизм которой пока непонятен и требует дальнейшего изучения;

г) нормализация кислотно-основного состояния, в основном, за счет сохранения карбонатного буфера крови;

д) ингибирование ПОЛ за счет ограничения гипоксии тканей и повышения активности антиоксидантной системы. Кроме того, можно предположить наличие прямого антиоксидантного действия ФХЛ за счет абсорбции на их поверхности реактивных форм кислорода;

е) нормализация состояния сердечно-сосудистой системы, кроме названных ранее причин, связана также с прямым влиянием липосом на функциональную активность эндотелия.

Липосомы могут играть роль своеобразного хранилища, из которого препарат высвобождается постепенно, в нужных дозах и в течение необходимого времени. Данные, накопленные за последние годы, подтверждают способность липосом транспортировать лекарственное средство, снижать его общетоксическое действие, повышать терапевтический эффект. Кроме того, липосомы обладают тропностью к поврежденным тканям и могут выступать в качестве носителей для направленного транспорта лекарственных веществ. Липосомальные формы лекарственных препаратов позволяют преодолеть барьер водонерастворимости последних и применять эти препараты для внутривенного введения.

Известно, что развитие и течение многих патологических процессов во многом определяется изменениями активности некоторых ферментов (энзимов). Как правило, это выражается в их избыточной активности. Среди веществ, обладающих энзимингибирующими эффектами, особое внимание привлекают биофлавоноиды, особенно, кверцетин, оказывающий выраженное тормозящее действие на активность липоксигеназ и ряда других ферментов (протеинкиназы С, фосфодиэстеразы и др.) и обладает выраженной антиоксидантной активностью. Поэтому с целью усиления антигипоксического и антиоксидантного действия липосом целесообразной представлялась разработка технологии введения в их структуру кверцетина (зарегистрированный в Украине препарат Липофлавон®).

Внутривенное введение суспензии липосомальной формы кверцетина (ЛФКв) непосредственно перед восстановлением кровотока в венечной артерии не вызывает изменений кардио- и системного кровообращения у животных при моделировании острой ишемии миокарда. Использование липосомальной формы кверцетина, по сравнению с «пустыми» ФХЛ, приводит к полноценному восстановлению коронарного кровотока в послеокклюзионном периоде. Введение в значительной степени уменьшает проявления характерного для репеперфузионного периода окислительного стресса и предупреждает повышение содержания лейкотриенов C_4 и E_4. Синтез простациклина при этом не уменьшается, что говорит о достаточной специфичности ингибирующего действия ЛФКв в отношении липоксигеназы-5. Следует отметить нормализацию ритма сердечных сокращений как при ишемии, так и в реперфузионном периоде при применении ФХЛ, содержащих кверцетин. Несмотря на то, что при введении липосомальной формы кверцетина зона риска оказывается несколько большей, размер зоны некроза миокарда уменьшается в два раза, а соотношение площадь инфаркта к площади риска более чем в три раза меньше по сравнению с «нелеченными» животными [43–44].

Нарушения сократительной активности миокарда и сердечного ритма, включая летальные желудочковые аритмии, часто возникают вследствие реперфузионных повреждений миокардиоцитов. К повреждению клеток мио-

карда в течение реперфузии приводят многие процессы. Одним из основных компонентов этого каскада событий может являться образование радикала пероксинитрита ($ONOO^-$), быстрое соединение NO^- с супероксидным радикалом кислорода приводит к образованию этого очень активного и относительно долгоживущего оксиданта, обладающего способностью инициировать перекисное окисление липидов. Основной причиной токсичности пероксинитрита является его относительная стабильность как аниона и его способность окислять сульфгидрильные группы со скоростью в 1000 раз большей, чем перекись водорода.

В папиллярной мышце при постоянной электрической стимуляции при добавлении в перфузионный раствор пероксинитрит вызывает зависимые от дозы быстроразвивающиеся и продолжительные двухфазные изменения амплитуды сокращения – после кратковременного транзиторного увеличения амплитуда сокращения становится в два раза меньшей по сравнению с исходной величиной. Наряду с описанными изменениями амплитуды сокращения, пероксинитрит вызывает появление (одного или больше) сокращения, не связанного с навязанным ритмом, что в целостном организме можно расценивать как возникновение эктопического очага возбуждения. Добавление в перфузионный раствор липосомальной формы кверцетина сразу после введения пероксинитрита позволяет эффективно предотвратить развитие аритмии и восстановить сократительную активность папиллярной мышцы крысы [44].

Добавление в перфузионный раствор, омывающий изолированное сердце крысы, пероксинитрита в концентрации 100 мкмоль/л позволяет моделировать ухудшение функционального состояния сердца до уровня, характерного для реперфузионного периода. Введение пероксинитрита приводит к снижению коронарного перфузионного давления, давления в левом желудочке и сопровождается развитием тахиаритмии с появлением частых одиночных экстрасистол, которая не исчезает даже при отмывании препарата.

При внутривенном введении крысам пероксинитрита возникают нарушения ритма сердечных сокращений, сопровождавшиеся появлением желудочковых экстрасистол, угнетается сократительная активность миокарда. Вслед за этим снижается давление в полости левого желудочка и аорте. В последующие 20 мин после введения пероксинитрита нормальные ритм сокращений и уровень давления крови восстанавливаются. Липосомальная форма кверцетина, в зависимости от времени введения, или практически полностью предотвращает, или в значительной степени корригирует описанные нарушения [44, 45].

Получены также доказательства целесообразности применения этого препарата при лечении диабетической ретинопатии [46], нормализует калиевую проводимость [47] и эндотелийзависимое расслабление сосудов [48] у диабетических крыс.

Известно, что при воздействии ионизирующего облучения сильно страдает калиевая проводимость сосудистых гладкомышечных клеток. Установлено, что липосомальный кверцетин обладает способностью эффективно восстанавливать проводимость Ca^{2+}зависимых калиевых каналов большой проводимости у облученных крыс [49].

Совсем недавно мы показали, что терапевтический эффект липосомального кверцетина связан с его способностью восстанавливать функцию одиночных Ca^{2+}зависимых калиевых каналов большой проводимости в условиях окислительного стресса [50].

Перспективным может оказаться и включение в состав липосом цитохрома С, водорастворимая форма которого используется при коррекции острой массивной кровопотери. Есть сведения о положительных результатах применения липосомальной формы цитохрома С на модели острой ишемии миокарда. Введение такого препарата при окклюзии коронарной артерии снижало количество случаев нарушений ритма сердечных сокращений. При этом было продемонстрировано уменьшение индекса повреждения миокарда более, чем в два раза.

Созданная в сотрудничестве с коллективом ТОВ «НаноМедТех» (г. Киев) липосомальная форма цитохрома С при коррекции нарушений кровообращения, вызванных острой массивной кровопотерей (более 33 % объема циркулирующей крови), приводит к коррекции нарушений гемостаза и предотвращает развитие синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания, способствуя 100 % выживаемости животных в течение всего периода наблюдения [51, 52].

Химические сигналы эндотелиального происхождения, и особенно оксид азота (NO), играют ключевую сигнальную роль в регуляции сосудистого тонуса, и таким образом они контролируют кровяное давление и кровоснабжение различных тканей и органов. Расстройства функций эндотелиоцитов и ГМК сосудов приводят к развитию заболеваний сердечно-сосудистой системы, которые являются основными причинами смертности (статистика ВОЗ).

Дозозависимое действие NO является одной из его наиболее интересных характеристик. В физиологических концентрациях NO играет ключевую роль в поддержании гомеостаза, но становится цитотоксичным при высоком содержании. Плейотропные эффекты NO включают антиатерогенез, вазодилатацию, ингибирование пролиферации гладких мышц и агрегацию тромбоцитов. Основным механизмом расслабления сосудов под влиянием NO является активация растворимой гуанилатциклазы с накоплением цГМФ. В последующем в процесс вовлекаются цГМФ-зависимая протеинкиназа и K^+ каналы, что приводит к гиперполяризации мембраны ГМК, деактивации потенциал-управляемых Ca^{2+} каналов L-типа, снижению концентрации цитозольного Ca^{2+} и, в конечном счете, к расслаблению сосудов.

Многочисленные патологические процессы, такие как гипертония, атеросклероз, нарушение кровотока в центральной нервной системе и неспособность к сосудистому ремоделированию, вызваны недостаточностью эндогенного синтеза/высвобождения NO. В таких случаях дополнительное введение NO может быть очень эффективной стратегией в лечении заболеваний, связанных с указанными патологическими процессами.

В настоящее время обычно используются так называемые гидрофильные доноры оксида азота, но возможности их эффективного применения ограничены очень коротким периодом полураспада самого оксида азота. Есть свидетельства о многочисленных попытках контролировать период полувыведения NO, включая и использование носителей на основе липидов, что обусловлено биосовместимостью и универсальностью самих носителей. Известные липосомальные формы оксида азота требуют для высвобождения NO воздействия внешних физических факторов (ультразвук, лазерное облучение) или содержат химические соединения (доноры NO), которые имеют низкую вазодилатирующую активность. Перспективной стратегией могло бы стать конструирование NO-высвобождающих липидных бислоев с использованием имитирующих глутатионпероксидазу катализаторов или липофильных доноров, таких как нитролеат, вместо обычных гидрофильных доноров NO. Несмотря на большое количество исследований по использованию различных типов носителей на основе липидов для инкапсуляции доноров NO, стабильность лекарственной формы все еще является серьезной проблемой. В целом, это обусловлено коротким периодом полураспада доноров NO в водных растворах.

Однако физиологическую активность имеет не только NO, но и многочисленные продукты его преобразования. Среди них особое место занимают пероксинитрит, нитриты и нитраты, а также нитрозотиолы, гемовые и негемовые нитрозильные комплексы. За исключением пероксинитрита, все они способны при определенных условиях выделять оксид азота в свободном виде и, таким образом, являются его депо.

Разработка современных доноров оксида азота, обладающих способностью контролируемого и дозированного высвобождения действующего вещества, представляет собой чрезвычайно слож-

ную задачу. Проблема заключается в том, что молекула NO, попадая в окружающую среду, быстро превращается в малоактивные, с точки зрения воздействия на гладкие мышцы, вещества. Иными словами, его действующая концентрация в тканях или крови быстро падает. С другой стороны, слишком большой выход оксида азота из переносчика может привести к образованию токсичного пероксинитрита за счет его окисления супероксидным радикалом.

Создание липидной системы доставки NO, способной обеспечить естественную скорость высвобождения, и разработка ее стабильной лекарственной формы стало следующей целью наших исследований. Часть этой работы была проведена при поддержке Министерства образования и науки Украины (договор от 14.11.2017 № ДЗ/28-2017).

Мы решили обратить внимание на возможность транспорта оксида азота с помощью липофильного донора из-за того, что оксид азота хорошо растворяется в фосфолипидах. Выбор вида липосом и жирнокислотный состав фосфолипидов, в свою очередь, ставит задачу перебора большого количества комбинаций и соответствующих расчетов. Возникла необходимость создания и виртуального скрининга большого количества химических транспортеров оксида азота с различными константами скоростей диссоциации действующего вещества с носителем. При математическом моделировании химических реакций диссоциации нами были выбраны те молекулярные конструкты, которые обладают оптимальными характеристиками, позволяющими поддерживать физиологическую концентрацию оксида азота в крови и тканях при различных уровнях напряжения кислорода и pH. Важным гемопротеином, способным создавать нитрозильные комплексы, является цитохром С. Свойство цитохрома С как в окисленном, так и в восстановленном состоянии (cyt c^{2+} и cyt c^{3+}) образовывать нитрозильные комплексы и определило наш выбор такого донора NO.

Для решения задачи – превращение цитохрома С в источник NO – мы использовали его включение в липосомы, состоящие из нейтральных и заряженных фосфолипидов. Липосомы, мембраной которых является фосфолипидный бислой, стали матриксом для прохождения на их поверхности окислительно-восстановительных реакций подобно внутренней мембране митохондрий. Иными словами, происходит имитация природных условий, при которых цитохром С способен присоединять и отдавать NO в присутствии липидов. В этих условиях цитохром С взаимодействует с некоторыми фосфолипидами и позволяет провести реакцию восстановления гема оксидом азота (II) и удерживать NO в своей молекуле.

Восстановленный липосомальный цитохром С – соединение нестабильное и в определенных условиях стремится перейти к окисленному состоянию, отдавая при этом оксид азота во внешнюю среду. Для стабилизации восстановленной формы цитохрома С и депонирования NO мы использовали определенный pH буферного раствора и последующую лиофилизацию липосом с включенным в них цитохромом С. В водной эмульсии содержащийся в лиофилизате цитохром С, стремясь к своему энергетически выгодному окисленному состоянию, постепенно высвобождает оксид азота в раствор.

В результате скрининговых исследований нескольких серий сконструированной липосомальной формы оксида азота был выбран образец, обладающий высокой активностью. Проведенные исследования специфического действия этого тест-образца свидетельствуют о чрезвычайно высокой дилататорной, антиишемической и, вероятно, антиаритмической активности липосомальной формы оксида азота, что подтверждается следующими данными:

1) на препаратах сегментов интактной аорты крыс липосомальная форма оксида азота вызывает их выраженное дозозависимое расслабление;
2) однократное внутривенное введение данного соединения крысам сопровождается дозозависимой и продолжительной гипотензивной реакцией системного кровообращения;

3) добавление в раствор для перфузии изолированного сердца водной суспензии липосомальной формы оксида азота приводит к уменьшению коронарного перфузионного давления, что обусловлено снижением тонуса коронарных артерий;
4) перфузия эмульсией липосомальной формы оксида азота изолированного сердца как при его субтотальной ишемии, так и только при реперфузии предотвращает развитие критических нарушений насосной функции сердца и способствует сохранению его сократительной активности;
5) антиаритмическое действие подтверждается отсутствием нарушений ритма сердечных сокращений как при ишемии, так и в реперфузионном периоде. В пользу этого свидетельствует и отсутствие пролонгации интервала QTC ЭКГ;
6) действие липосомальной формы оксида азота проявляется значительным дозозависимым расслаблением полосок пещеристых телец полового члена и миометрия;
7) NO-содержащий липосомальный конструкт эффективно открывает одиночные кальций-зависимые калиевые каналы большой проводимости в сосудистых гладких мышцах и значительно увеличивает вероятность их нахождения в открытом состоянии.

Таким образом, препарат обещает быть эффективным при лечении ангиопатий различного генеза (включая, конечно, и диабетическую), эректильной дисфункции, гиперактивного мочевого пузыря, артериальной гипертензии, геморагического и ишемического инсульта. Учитывая возможность его применения в ингаляционной форме, он может быть использован для лечения легочной гипертензии.

Важно отметить, что фармако-токсикологические характеристики (острая и подострая токсичность) липосомальной формы оксида азота указывают на ее принадлежность к классу малотоксичных фармакологически активных соединений.

Хочется думать, что это еще не конец истории, и липосомы откроют нам еще не одну свою тайну. Несомненно, что их потенциальные возможности существенно выше известных нам к настоящему времени. Мы только начали понимать, как липосомы работают с клеткой. Время новых открытий впереди. Например, комбинации липосом с наночастицами золота и интерферирующими РНК откроют новые перспективы таргетной терапии заболеваний человека. Хорошо бы, если бы также думали и те, от кого зависит финансирование украинской науки.

Авторы выражают свою искреннюю благодарность и признательность всем своим коллегам, принимавшим на разных этапах участие в работе с липосомальными препаратами: В. В. Прохорову, А. В. Жолосу, А. В. Паршикову, С. М. Тишкину, С. В. Кириченко, И. Л. Мончаку, И. В. Кизубу, И. В. Ивановой, Н. В. Добреле, Е. В. Стрелкову, Т. В. Новохацкой, Е. И. Клименко, М. И. Мельник, Д. О. Дрынь.

1. *Pattni B. S., Chupin V. V., Torchilin V. P.* New Developments in Liposomal Drug Delivery. *Chem. Rev.* 2015. 115. V. 19. P. 10938–10966.
2. *Кобринский Г.* Липосомы в медицине. *Наука и жизнь*. 1988. № 6. С. 23–30.
3. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: The Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. Task Force Members. G. Montalescot, U. Sechtem, S. Achenbach et al. *Eur Heart J.* 2013. V. 34, № 38. P. 2949–3003.
4. *Balla C., Pavasini R., Ferrari R*. Treatment of Angina: Where Are We? *Cardiology*. 2018. V. 140. P. 52–67.
5. *Meerbaum S*. Myocardial Perfusion, Reperfusion, Coronary Venous Retroperfusion. Springer Science & Business Media, 2013. 246 p.
6. Pathophysiology of Heart Failure. N. S. Dhalla, P. K. Singal, N. Takeda, R. E. Beamish. Springer Science & Business Media, 2012. 578 p.
7. Resistive Cerebral Blood Flow as a Potential Marker of Subclinical Brain Damage in Essential Hypertension. S. González-García, Z. Hernández-Díaz, L. Quevedo-Sotolongo et al. *World Journal of Cardiovascular Diseases.* 2014. V. 4, № 4. P. 169 – 178.

8. *Beckman J. A., Creager M. A*. Vascular Complications of Diabetes. *Circ Res*. 2016. V. 118. P. 1771–1785.
9. Endothelial dysfunction and erectile dysfunction in the aging man. A. Aversa, R. Bruzziches, D. Francomano M. et al. *International Journal of Urology*. 2010. V. 17, № 1. P. 38–47.
10. *Deanfield J. E., Halcox J. P., Rabelink T. J*. Endothelial Function and Dysfunction. *Circulation*. 2007. V. 115, № 10. P. 1285–1295.
11. *Allon N., Shapira S., Weissman B. A*. Biochemical, Pharmacological, and Clinical Aspects of Nitric Oxide. Springer Science & Business Media. 2012. 248 p.
12. *Toda N*. Age-related changes in endothelial function and blood flow regulation. *Pharmacology and Therapeutics*. 2012. V. 133, № 2. P. 159–176.
13. Age and gender differences of endothelial function in 4739 healthy adults: the HUNT3 Fitness Study. E.-A. Skaug, S. Th. Aspenes, L. Oldervoll et al. *European Journal of Preventive Cardiology*. 2012. V. 20, № 4. P. 531–540.
14. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. H. Brunner, J. R. Cockcroft, J. Deanfield et al. *J. Hypertens*. 2005. V. 23, № 2. P. 233–246.
15. Liposome Technology: [in 3 vol.]. New York – London : Informa, 2006–2007. [Ed. Gregoriadis G.]. [3-ed edition]. V. 3: Interactions of liposomes with the biological milieu. 2007. 464 p.
16. *Patel S. S*. Liposome: A versatile platform for targeted delivery of drugs. *Pharmaceutical review*. 2006. V. 4, № 5. P. 1–10.
17. *Singh E.* A novel drug delivery system on liposomes: a review. Novel Science. *International Journal of Pharmaceutical Science*. 2012. V. 1, № 5. P. 220–227.
18. Phospholipid Vesicles (Liposomes) Restore Endothelium-Dependent Cholinergic Relaxation in Thoracic Aorta from Spontaneously Hypertensive Rats. A. Soloviev, A. Stefanov, O. Bazilyuk, V. Sagach *J. of Hypertens*. 1993. V. 11. P. 623-637.
19. *Хромов О. С., Соловйов А. І*. Експериментальне обґрунтування застосування фосфатидилхолінових ліпосом в медицині. *Фармакологія та лікарська токсикологія.* 2008. № 4. С.88 –98.
20. Preparation, characterization, and use of antioxidant-liposomes. H. Yang, V. Paromov, M. Smith, W. L. Stone. *Methods Mol. Biol.* 2008. V. 477. P. 277–292.
21. *Хромов О. С., Стефанов О. В., Данова І. В*. Протигіпоксична та антиоксидантна дія різних фосфоліпідів у ліпосомальній формі. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2010. № 4 (17). С. 70–78.
22. *Стефанов А. В., Соловьев А. И., Лишко В. К*. Механизм взаимодействия липосом, содержащих Ca^{2+}, с гладкомышечными клетками сосудов. *Биол. мембраны*. 1985. Т. 2, №5. С. 470–476.
23. Liposomal potentiation of the antitumor activity of alkylating drugs. R. Rutman, C. Ritter, N. Avadhani, J. Hausel. *Cancer Treat. Repts*. 1976. V. 60, № 5. P. 617–618.
24. *Palmer T. N.* Mechanism of liposome accumulation in infarction. *BBA*. 1984. V. 787. № 3. P. 363–368.
25. *Sapra P. Allen T. M*. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Progress in Lipid Research*. 2003. V. 42. P. 439–462.
26. *Стефанов А. В., Соловьев А. И*. Влияние липосом на электрическую и сократительную активность сосудистых гладких мышц. *Докл. АН СССР.* 1983. Т. 273, № 1. С. 227–230.
27. *Soloviev A., Bazilyuk O., Stefanov A*. Phospholipid vesicles (liposomes) possess the ability to support vascular smooth muscle contractile activity under hypoxia. *Biol. Membr.* 1993. V. 6, № 5. P. 667–675.
28. Changes in Membrane Ionic Permeability and Related Contractile Responses in Vascular Smooth Muscle at Hypoxia. A. Soloviev, A. Stefanov, O. Bazilyuk et al. *Pathophysiology*. 1996. V. 3. P. 11–20.
29. Saline containing phosphatidylcholine liposomes possess the ability to restore endothelial function damaged resulting from G-irradiation. A. I. Soloviev, A. V. Stefanov, S. M. Tishkin et al. *J. of Physiology and Pharmacology*. 2002. V. 53, № 4. P. 701–712.
30. *Соловьев А. И., Базилюк О. В*. Влияние ограничения оксигенации гладких мышц сосудов на сократительные эффекты прямой электрической и механической стимуляции. *Бюлл. эксперим. биол. и мед*. 1981. № 11. С. 92–95.
31. Биологический эффект липосом при гипоксических состояниях различной этиологии А. В. Стефанов, В. П. Пожаров, Т. Д. Миняйленко и др. *Вестник АМН СССР.* 1990. № 6. С. 47–51.
32. *Шестаков В. І., Максимов Ю. М*. Зміни поверхневоактивних речовин легенів щурів при дії діоксиду сірки і лікуванні ліпіном. *Современные проблемы токсикологии*. 1999. № 4. С. 29–32.
33. *Стефанов О. В. Юхимець В. О., Бригінський С. О*. Фармакокінетика ліпіну при інтрахеальному введенні. *Ліки*. 1995. № 4. С. 29–35.
34. *Юхимець В. О., Стежка В. А*. Вплив інгаляцій Ліпіну на стан окислювального та структурно-функціонального гомеостазу хворих на бронхообструктивні захворювання. *Укр. пульмонолог. журнал*. 1996. № 1. С. 24–29.

35. Предупреждение постишемических повреждений миокарда с помощью липосом. А. В. Стефанов, А. С. Хромов, А. В. Жукова и др. *Бюлл. эксперим. биол. и мед*. 1992. Т. 113, № 6. С. 590–593.
36. *Стрєлков Є. В., Хромов О. С.* Механізм розвитку гіпоксичної легеневої гіпертензії та її фармакологічна корекція. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2009. Т. 11, № 4. С. 20–25.
37. Зміна скорочувальної функції судин при артеріальній гіпертензії різного генезу та її корекція за допомогою фосфатидилхолінових ліпосом. А. І. Соловйов, С. М. Тишкін, О. С. Хромов, О. В. Стефанов. *Фізіологічний журнал*. 2002. Т. 48, № 6. С. 10–16.
38. *Добреля Н. В., Хромов О. С., Соловйов А. І.* Особливості антигіпертензивної дії фосфатидилхолінових ліпосом при артеріальній гіпертензії різного генезу (експериментальне дослідження). Фармакологія та лікарська токсикологія. 2012. № 4. С. 16–21.
39. *Хромов О. С., Стефанов О. В., Пожаров В. П.* Коррекція за допомогою ліпосом (ліпіну) порушень центральної гемодинаміки у щурів під час геморагічного шоку. *Ліки*. 1995. № 4. С. 54–60.
40. О некоторых механизмах недостаточности кровообращения при септическом шоке. А. С. Хромов, В. Ф. Сагач, А. В. Дмитриева, Л. Б. Доломан. *Физиологический журнал*. 1990. Т. 36, № 6. С. 13–17.
41. *Стефанов А. В., Крейнес В. М., Лишко В. К.* Использование липосом в качестве неспецифического детоксикатора при синдроме длительного раздавливания. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1984. Т. 97, № 5. С. 569–571.
42. *Хромов О. С.* Корекція ендотоксемії при критичних станах в експерименті за допомогою ліпосом. *Ліки*. 2005. № 1–2. С. 22–26.
43. Вплив ліпосомальної форми кверцетину на зміни гемодинаміки, кардіодинаміки та коронарного кровообігу при ішемії та реперфузії міокарда. О. О. Мойбенко, О. В. Стефанов, Л. А. Грабовский та ін. *Ліки*. 1995. № 4. С. 95–103.
44. Arrhythmogenic Peroxynitrite-Induced Alterations in Mammalian Heart Contractility and Its Prevention with Quercetine-Filled Liposomes. A. Soloviev, A. Stefanov, A. Khromov et all. *Cardiovascular Toxicology*. 2002. V. 2, № 2. P. 129–140.
45. Аритмогенное действие пероксинитрита и его коррекция с помощью липосомального кверцетина. А. С. Хромов, А. И. Соловьев, А. В. Стефанов и др. Гипоксия, автоматизированный анализ гипоксических состояний: сб. научн. трудов; ред. А. З. Колчинская. Т. 2. Москва-Нальчик, 2005. С. 108–113.
46. *Іванова Н. В., Ярошева Н. А.* Патогенетичне обґрунтування застосування ліпофлавону у хворих з різними формами діабетичної ретинопатії. *Клінічна фармація*. 2008. Т. 12, № 2. С. 11-16.
47. Вплив ліпофлавону на сумарний вихідний K^+ струм у гладеньком'язових клітинах аорти щурів із цукровим діабетом. К. Клименко, Т. Новохацька, І. Кізуб, А. Соловйов. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2012. № 5 (30). С. 31–36.
48. *Клименко К., Паршиков О., Соловйов А.* Застосування ліпофлавону для фармакологічної корекції ендотеліальної дисфункції у щурів за умов цукрового діабету. *Біологічні Студії/Studia Biologica.* 2013. Т. 7, № 3. С. 47–58.
49. *Soloviev A., Tishkin S., Kyrychenko S*. Quercetin-filled phosphatidylcholine liposomes restore abnormalities in rat thoracic aorta BK_{Ca} channel function following ionizing irradiation. *Acta Physiol. Sinica, Cheng Li Xue Bao*. 2009. V. 61, № 3. P. 201–210.
50. Liposomal Quercetin Potentiates Maxi-K Channels and Restores its Activity after Oxidative Stress. M. I. Melnyk, D. O. Dryn, L. T. Al Kury et all. *J Liposome Res*. 2019. V. 29, № 1. P. 94–101.
51. Корекція порушень гемостазу при гострій масивній крововтраті ліпосомальними препаратами. Н. В. Добреля, Т. А Карацуба. Н. С. Гула та ін. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2016. № 1. С. 66–71.
52. Перспективи використання ліпосомальної форми цитохрому С для поповнення гострої масивної крововтрати. Н. В. Добреля, Н. С. Гула, Т.А. Карацуба, О. С. Хромов. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2018. № 2. С.14–24.

А. И. Соловьев, А. С. Хромов

От «пустой» липосомы до сложной наноструктуры

В работе подводятся некоторые итоги почти 40-летней работы авторов в области липосомологии, начатые в 80-х годах прошлого века под руководством академика НАМН Украины Александра Викторовича Стефанова.

Создание нужной концентрации лекарственных веществ в органе-мишени, не затрагивая при этом не вовлеченные в патологический процесс органы и ткани, – задача непростая. За последние несколько лет предпринято множество попыток решить эту проблему, и оказалось, что лучшими переносчиками лекарств являются именно липосомы.

Преимущества липосом перед другими носителями обусловлены такими их свойствами:

– сродство с природными мембранами клеток по химическому составу;
– универсальность. Липосомы способны переносить разнообразные фармакологически активные вещества, а также дополнительные источники энергии для клетки и генетический материал;

– липосомы сравнительно легко биодеградируют, высвобождая доставленные вещества. В пути следования липосомы надежно укрывают свое содержимое от контакта с иммунной системой и не вызывают защитных и аллергических реакций организма;
– способ взаимодействия липосом с клетками, который происходит в разных формах. При этом могут изменяться свойства клеточных мембран, например: вязкость и проницаемость; величина электрического заряда; фосфолипидное окружение ферментов и ионных каналов и, соответственно, их активность (вот почему даже так называемая пустая липосома может быть биологически активным агентом).

Благодаря липосомам появляется новый способ направленного воздействия на клетку, который можно назвать «мембранной инженерией», то есть, появляется возможность модифицировать клеточную мембрану в заданном направлении.

Оказалось, что липосомы могут быть не только переносчиками лекарств, но и обладают самостоятельной биологической активностью. Продемонстрирована способность так называемых пустых фосфатидилхолиновых липосом (ФХЛ) оказывать влияние на электрическую и сократительную активность сосудистых гладких мышц. При гипоксии ФХЛ восстанавливают измененную для ионов проницаемость плазматических мембран гладких мышц сосудов, а у крыс со спонтанной артериальной гипертензией улучшают эндотелий-зависимые дилататорные реакции сосудов. Кроме того, было показано, что «пустые» ФХЛ эффективно восстанавливают вызванное ацетилхолином эндотелий-зависимое расслабление изолированных колец грудной аорты, нарушенное воздействием гамма-облучения. Липосомы также восстанавливают пониженную после облучения чувствительность сосудистой ткани к ацетилхолину и оксиду азота.

С целью усиления антигипоксического и антиоксидантного действия липосом в их структуру был внедрен антиоксидант кверцетин. Использование липосомальной формы кверцетина приводит к полноценному восстановлению коронарного кровотока в послеокклюзионном периоде при острой субтотальной ишемии миокарда, в значительной степени уменьшает проявления характерного для репеперфузионного периода окислительного стресса и предупреждает повышение содержания лейкотриенов C_4 и E_4. Синтез простациклина при этом не уменьшается. Применение липосомальной формы кверцетина приводит к уменьшению зоны некроза миокарда в два раза. Липосомальная форма кверцетина практически полностью предотвращает или в значительной степени корригирует нарушения ритма сердечных сокращений и восстанавливает сократительную активность миокарда.

Липосомальная форма кверцетина эффективно восстанавливает функцию калиевых каналов большой проводимости у облученных крыс.

Перспективным может оказаться включение в состав липосом цитохрома С. Липосомальная форма цитохрома С приводит к коррекции нарушений гемостаза и предотвращает развитие синдрома ДВС при острой массивной кровопотере.

Многочисленные патологические процессы, такие как гипертония, атеросклероз, нарушение кровотока в центральной нервной системе, вызваны недостаточностью эндогенного синтеза/высвобождения NO. В таких случаях дополнительное введение NO может быть очень эффективной стратегией в лечении заболеваний, связанных с указанными патологическими процессами.

Разработка современных доноров оксида азота, обладающих способностью контролируемого и дозированного высвобождения действующего вещества, представляет собой чрезвычайно сложную задачу. Создание липидной системы доставки NO, способной обеспечить естественную скорость высвобождения, и разработка ее стабильной лекарственной формы стало следующей целью наших исследований.

Проведенные исследования специфического действия сконструированной липосомальной формы оксида азота (ЛФ NO) свидетельствуют о его ее чрезвычайно высокой дилататорной, антиишемической активности. Это подтверждается выраженным дозозависимым расслаблением сегментов интактной аорты крыс и продолжительной гипотензивной реакцией системного кровообращения. ЛФ NO предотвращает развитие критических нарушений насосной функции сердца и способствует сохранению его сократительной активности при субтотальной ишемии. Действие ЛФ NO проявляется значительным также дозозависимым расслаблением полосок пещеристых тел полового члена и миометрия.

Новый NO-содержащий липосомальный конструкт эффективно открывает одиночные кальций-зависимые калиевые каналы большой проводимости в сосудистых гладких мышцах и значительно увеличивает вероятность их нахождения в открытом состоянии.

Таким образом, ЛФ NO обещает быть эффективной при лечении ангиопатий различного генеза (включая диабетическую), эректильной дисфункции, гиперактивного мочевого пузыря, артериальной гипертензии, геморрагического и ишемического инсульта. Учитывая возможность применения в ингаляционной форме, она может быть использована для лечения легочной гипертензии.

Высказывается мнение, что потенциальные возможности липосом существенно выше пока известных нам. Мы только начали понимать, как липосомы работают с клеткой.

Ключевые слова: липосомы, наноструктуры

А. І. Соловйов, О. С. Хромов

Від «порожньої» ліпосоми до складної наноструктури

У роботі підводяться деякі підсумки майже 40-річної роботи авторів в області ліпосомології, які були розпочаті в 80-х роках минулого століття під керівництвом академіка НАМН України Олександра Вікторовича Стефанова.

Створення потрібної концентрації лікарських речовин в органі мішені, не зачіпаючи при цьому не залучені в патологічний процес органи та тканини, – завдання непросте. За останні кілька років зроблено безліч спроб вирішити цю проблему, й виявилося, що кращими переносниками ліків є саме ліпосоми.

Переваги ліпосом перед іншими носіями зумовлені такими їхніми властивостями:

– спорідненість з природними мембранами клітин за хімічним складом;
– універсальність. Ліпосоми здатні переносити різноманітні фармакологічно активні речовини, а також додаткові джерела енергії для клітини, генетичний матеріал;
– ліпосоми легко біодеградують, вивільняючи доставлені речовини. На шляху прямування ліпосоми надійно вкривають свій вміст від контакту з імунною системою і не викликають захисних й алергічних реакцій організму;
– різні форми взаємодії ліпосом з клітинами. За цих умов можуть змінюватися властивості клітинних мембран, наприклад: в'язкість і проникність; величина електричного заряду; фосфоліпідне оточення ферментів й іонних каналів і, відповідно, їхня активність (ось чому навіть так звана порожня ліпосома може бути біологічно активним агентом).

Завдяки ліпосомам з'являється новий спосіб спрямованого впливу на клітину, який можна назвати «мембранною інженерією», тобто з'являється можливість модифікувати клітинну мембрану в заданому напрямі.

Виявилося, що ліпосоми можуть бути не тільки переносниками ліків, але й мають самостійну біологічну активність. Продемонстровано здатність так званих порожніх фосфатидилхолінових ліпосом (ФХЛ) впливати на електричну та скоротливу активність судинних гладеньких м'язів. За гіпоксії ФХЛ відновлюють змінену для іонів проникність плазматичних мембран гладеньких м'язів судин, а в щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією покращують ендотелій-залежні дилататорні реакції судин. Крім того, було показано, що «порожні» ФХЛ ефективно відновлюють викликане ацетилхоліном ендотелій-залежне розслаблення ізольованих кілець грудної аорти, порушене впливом гамма-опромінення. Ліпосоми також відновлюють знижену після опромінення чутливість судинної тканини до ацетилхоліну й оксиду азоту.

Із метою посилення антигіпоксичної та антиоксидантної дії ліпосом в їхню структуру був включений антиоксидант кверцетин. Використання ліпосомальної форми кверцетину призводить до повноцінного відновлення коронарного кровотоку в постокклюзійному періоді за гострої субтотальної ішемії міокарда, значною мірою зменшує прояви характерного для репеперфузіонного періоду окисного стресу та попереджає підвищення вмісту лейкотрієнів C_4 і E_4. Синтез простацикліну в цьому разі не зменшується. Застосування ліпосомальної форми кверцетину призводить до зменшення зони некрозу міокарда в два рази. Ліпосомальна форма кверцетину практично повністю запобігає або значною мірою коригує порушення ритму серцевих скорочень і відновлює скоротливу активність міокарда.

Ліпосомальна форма кверцетину ефективно відновлює функцію калієвих каналів великої провідності в опромінених щурів.

Перспективним може виявитися включення до складу ліпосом цитохрому С. Ліпосомальна форма цитохрому С призводить до корекції порушень гемостазу та запобігає розвитку синдрому ДВС у разі гострої масивної крововтрати.

Численні патологічні процеси, такі як гіпертонія, атеросклероз, порушення кровотоку в центральній нервовій системі, викликані недостатністю ендогенного синтезу/вивільнення NO. У таких випадках додаткове введення NO може бути дуже ефективною стратегією в лікуванні захворювань, пов'язаних із зазначеними патологічними процесами.

Розробка сучасних донорів оксиду азоту, що характеризуються здатністю контрольованого та дозованого вивільнення діючої речовини, являє собою надзвичайно складну задачу. Створення ліпідної системи доставки NO, здатної забезпечити природну швидкість вивільнення, та розробка її стабільної лікарської форми стало наступною ціллю наших досліджень.

Проведені дослідження специфічної дії сконструйованої ліпосомальної форми оксиду азоту (ЛФ NO) свідчать про надзвичайно високу дилататорну, антиішемічну активність ліпосомальної форми оксиду азоту. Це підтверджується дозозалежним розслабленням сегментів інтактної аорти щурів і тривалою гіпотензивною реакцією системного кровообігу. ЛФ NO запобігає розвитку критичних порушень насосної функції серця та сприяє збереженню скорочувальної активності за його субтотальної ішемії. Дія ЛФ NO проявляється значним дозозалежним розслабленням смужок печеристих тілець статевого члена та міометрія.

Новий ліпосомальний конструкт, що містить NO, ефективно відкриває поодинокі кальцій-залежні калієві канали великої провідності в судинних гладеньких м'язах і значно збільшує ймовірність їхнього знаходження у відкритому стані.

Таким чином, ЛФ NO обіцяє бути ефективною для лікування ангіопатій різного генезу (включно з діабетичною), еректильної дисфункції, гіперактивного сечового міхура, артеріальної гіпертензії та геморагічного й ішемічного інсульту. З огляду на можливість застосування в інгаляційній формі, вона може бути використана для лікування легеневої гіпертензії.

Висловлюється думка, що потенційні можливості ліпосом суттєво більші, ніж досі нам відомі. Ми тільки почали розуміти, як ліпосоми працюють з клітиною.

Ключові слова: ліпосоми, наноструктури

A. I. Soloviev, A. S. Khromov

From «empty» liposome to complex nanostructure

The work summarizes some of the results of the nearly 40 years work of the authors in the field of liposomology, which started in the 80s of the last century under the leadership of Academician of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine Alexander Viktorovich Stefanov.

It is not an easy task to create the required concentration of active medicinal substances in the target organ without affecting organs and tissues not involved in the pathological process. Over the past few years, many attempts have been made to solve this problem, and it turned out that liposomes are the best drug carriers.

The advantages of liposomes over other drug carriers are due to their properties:

- chemical affinity with natural cell membranes;
- versatility. Liposomes are capable of carrying a wide range of pharmacologically active substances, including an additional energy sources for the cell activity and genetic material;
- liposomes biodegrade relatively easily, releasing the delivered substances. Along the way to target, liposomes reliably hide their contents from contact with the immune system and do not cause protective and allergic reactions of the organism;
- the way liposomes interact with cells, takes place in different forms. This interaction can change the properties of cell membranes, for example: viscosity and permeability; the amount of electric charge, phospholipid environment of enzymes and ion channels and, accordingly, their activity (this is why even the so-called empty liposomes can be a biologically active agents).

Thanks to liposomes, a new way of targeting the cell appears, which can be called «membrane engineering», i. e., it becomes possible to modify the cell membrane in a given direction.

It turned out that liposomes can be not only drug carriers, but also have independent biological activity. The ability of so-called empty phosphatidylcholine liposomes (PCLs) has been demonstrated to influence the electrical and contractile activity of vascular smooth muscles. In hypoxia, PCLs restore the normal ion permeability of the plasma membranes of vascular smooth muscles, and in rats with spontaneous arterial hypertension they improve the endothelium-dependent dilator reactions of the vessels. In addition, it was shown that «empty» PCLs effectively restore acetylcholine-induced endothelium-dependent relaxation of isolated rings of the thoracic aorta, damaged by exposure to gamma irradiation. Liposomes also restore the sensitivity of vascular tissue to acetylcholine and nitric oxide reduced after irradiation.

In order to enhance the antihypoxic and antioxidant action of liposomes, the antioxidant quercetin was introduced into their structure. The use of the liposomal form of quercetin (LF/Q) leads to a complete restoration of coronary blood flow in the post-occlusion period in acute subtotal myocardial ischemia, significantly reduces the manifestations of oxidative stress in the reperfusion period, and prevents an increase in the content of leukotrienes C_4 and E_4. The synthesis of prostacyclin does not decrease. The use of the LF/Q leads to a twofold decrease in the zone of myocardial necrosis. The LF/Q almost completely prevents or largely corrects disturbances in the rhythm of heart contractions and restores the contractile activity of the myocardium. The LF/Q effectively restores the function of high conductance potassium channels in irradiated rats.

The inclusion of cytochrome c in liposomes may be promising. The liposomal form of cytochrome c leads to the correction of hemostasis disorders and prevents the development of DBC syndrome in acute massive blood loss.

Numerous pathological processes such as hypertension, atherosclerosis, and impaired blood flow in the central nervous system are caused by a lack of endogenous synthesis and release of NO. In such cases, additional administration of NO can be a very effective strategy in the treatment of diseases associated with these pathological processes.

The development of modern nitric oxide donors capable of controlled and dosed release of the active ingredient is an extremely difficult task. The creation of a lipid NO delivery system capable of providing a natural release rate and the development of its stable dosage form became the next goal of our research.

Studies of the specific action of the designed liposomal form of nitric oxide (LF/NO) indicate an extremely high dilatatory, anti-ischemic activity of the LF/NO. This is confirmed by the pronounced dose-dependent relaxation of the segments of the intact rat aorta and the prolonged hypotensive reaction of the systemic circulation. LF/NO prevents the development of critical disorders of the heart pumping function and contributes to the preservation of its contractile activity during subtotal ischemia. The action of the LF/NO is also manifested by a significant dose-dependent relaxation of the stripes of the cavernous bodies of

the penis and myometrium.

The new NO-containing liposomal construct effectively opens single calcium-dependent potassium channels of high conductance in vascular smooth muscles and significantly increases the probability of their being in the open state.

Thus, the liposomal form of nitric oxide promises to be effective in the treatment of angiopathies of various origins (including diabetic), erectile dysfunction, overactive bladder, arterial hypertension, and hemorrhagic and ischemic stroke. Given the possibility of use in inhalation form, it can be used to treat pulmonary hypertension.

The opinion is expressed that the potentialities of liposomes are significantly higher than those known to us. We have just begun to understand how liposomes work with the cell.

Key words: liposomes, nanostructure

Надійшла: 11 червня 2020 р.

Прийнята до друку: 31 серпня 2020 р.

Контактна особа: Соловйов А. І., ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03680. Тел.: + 38 0 44 456 42 46.