

СОЗДАНИЕ ЛИПОСОМ ИЗ СОЕВОГО ЛЕЦИТИНА ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

И. А. Колтаков, Е. В. Шилова*, А. Н. Бражникова, В. Г. Артюхов

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 20.12.2021 г.

Аннотация. Создание липосомальных наночастиц является перспективным способом инкапсулирования лекарственных веществ. Липосомальные формы лекарственных веществ позволяют нивелировать возможный негативный эффект препарата на здоровые ткани, способствуют его более пролонгированному действию. Существуют различные методы стандартизации размеров липосом, одним из основных является ультразвуковая обработка. Ультразвуковая (УЗ) обработка – это простой метод уменьшения размера липосом и производства малых однослойных липосом. Целью настоящего исследования явилась разработка режимов стандартизации размеров липосом с помощью УЗ-обработки и изучение возможности включения в состав полученных липосом макромолекул белков. В данной работе методом гидратации/регидратации были получены липосомальные частицы из фосфатидилхолина. Для создания моноламеллярных структур и стандартизации размера липосом проводили их облучение ультразвуком в течение 1-20 минут (20кГц, 10 секундный импульс с перерывом 3 сек). Размер синтезированных липосом контролировали методом динамического рассеяния света. Было показано, что ультразвуковая обработка в указанном режиме в течение 15 минут способствует образованию липосомальных частиц с наиболее узким распределением по размеру (гидродинамический диаметр липосом составил 173.8 ± 12.5 нм). Важным параметром при получении липосомальных частиц является доля включения в липосомы лекарственного препарата. В случае пассивной загрузки в липосомы гидрофильных соединений их обычно растворяют в водной среде, используемой для гидратации липидной пленки. В зависимости от условий гидратации и свойств препарата меняется от 5 до 20%, а не загрузившийся препарат остается в водной среде, окружающей везикулы. В редких случаях пассивная загрузка гидрофильного препарата достигает 70%. В качестве модельных белков, включаемых в липосомы, использовали инсулин и гемоглобин. Концентрацию белков определяли методом Лоури. Включаемость инсулина составила 57.5 ± 2.2 %, включаемость гемоглобина составила 33.2 ± 2.8 %. При добавлении 8М мочевины включаемость инсулина резко снизилась и составила 13.1 ± 0.5 %. Сделано предположение о значительной роли гидрофобных взаимодействий в процессах включения белков в липосомы.

Ключевые слова: липосомы, инсулин, гемоглобин, УЗ-обработка

Сейчас в медицине и фармакологии все большую актуальность приобретает метод направленного транспорта лекарственных средств, позволяющий увеличить концентрацию доставляемых веществ в определенном месте и блокировать или сильно ограничить их накопление в здоровых органах и тканях. Направленный транспорт позволяет повысить продолжительность и эффективность действия лекарства, снизить побочные эффекты [1-10].

В настоящее время липосомы — одни из наиболее изученных наночастиц, которые можно рассматривать как эффективные средства доставки

различных ЛП. Одним из главных параметров, определяющих фармакодинамику липосомальных лекарственных средств, позволяющих наиболее полно реализовать возможности препаратов, является размер липосом. Из литературных данных известно, что в наибольшей степени продолжительное время в организме циркулируют частицы размером 150-170 нм. [11-17] За последние годы мировая фармацевтическая промышленность выпустила более 20 липосомных препаратов, которые применяют преимущественно в онкологии (Dauno Xome (Gilead, NeXstar), Doxil (Alza, Sequus), Caelyx (Schering-Plough), Myocet (Elan, TLC)) или в лечении грибковых инфекций (AmBisome, ABELSET (Gilead, NeXstar)) [5]. Особый интерес представля-

© Колтаков И. А., Шилова Е. В., Бражникова А. Н., Артюхов В. Г., 2022

ет возможность создания липосомальных белковых препаратов. Хотя механизм их всасывания в желудочно-кишечном тракте до конца не ясен, сообщений об их эффективности при пероральном приеме в литературе достаточно много. Так, например, несмотря на неоднозначные результаты относительно перорального применения липосомального инсулина при лечении сахарного диабета, исследования в этом направлении продолжаются, а некоторые фирмы предполагают наладить промышленный выпуск этого препарата [18]. Создание подобного рода лекарственных форм препаратов представляется актуальной и практически значимой задачей.

Целью настоящего исследования явилась разработка режимов стандартизации размеров липосом с помощью УЗ-обработки и изучение возможности включения в состав полученных липосом макромолекул белков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение липосомальных частиц из ФХ. Для получения липосом использовали соевый лецитин (Sigma). В состав соевого лецитина входят: фосфатидилхолин (мин. 90%), эндотоксин (макс. 6 ЕУ/гр), свободные жирные кислоты (макс. 0.5%). Липосомальные везикулы получали методом дегидратации/регидратации по следующей схеме.

Раствор лецитина в этиловом спирте (1%) испаряли в ротормном испарителе ИКА RV10 control при температуре водяной бани 60°C. В результате на стенке испарительной колбы получали плёнку липидов. Затем добавляли сантимолярный натрий-фосфатный буфер (рН=7.4) в объёме, равном объёму раствора лецитина в этиловом спирте, перемешивали в течение 1 минуты. [19]

Следующим этапом стала диспергенция получаемых липосом, для чего растворы были подвержены воздействию ультразвука. Облучение проводили на ультразвуком дезинтеграторе Qsonica Sonicators в течение 1-20 минут (20кГц, 10 секунд импульс с перерывом 3сек).

Изучение размеров синтезированных наночастиц методом динамического светорассеяния. Размер полученных липосом измеряли с помощью спектрометра динамического светорассеяния ZetasizerNanoZSP (Malvern, Великобритания). Измерения проводили в кювете с длиной оптического пути 1 см, при температуре 37° С.

Изучение процессов включения инсулина и гемоглобина в состав липосом. В качестве изучаемых агентов, включаемых в липосомы, нами были выбраны инсулин и гемоглобин.

Инсулин в концентрации 0.049 мг/мл и гемоглобин в концентрации 0.570 мг/мл вносили в натрий-фосфатный буфер перед добавлением к липидной плёнке. Молярное соотношение белок/липид составило $9 \cdot 10^{-3}$.

Отделение липосом от свободного белка проводили методом центрифугирования при 45 000 об/мин в течение 15 мин. Отделившиеся липосомы отбирали, ресуспензировали в требуемом объёме натрий-фосфатного буфера. Производили разрушение липосомальных частиц 1%-м раствором Triton X100 в течение 30 минут.

Концентрацию белка определяли методом Лоури. [20]

Процент включённого инсулина (В) определяли по формуле:

$$B = (C \times 100\%) / C_{исх},$$

где С - концентрация белка, определенная после разрушения липосом; $C_{исх}$ - концентрация белка при включении в липосомы

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакетов прикладных программ Microsoft Excel 2010. Достоверность различий контрольных и опытных величин устанавливали с использованием t-критерия Стьюдента. В процедурах статистического анализа рассчитывали достигнутый уровень значимости (р), при этом критический уровень значимости в данном исследовании принимали равным 0.05. Полученные данные были представлены в виде среднего арифметического и его стандартного отклонения ($M \pm Sd$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Было установлено, что при получении липосом без УЗ-обработки образуется гетерогенная система, содержащая несколько различных фракций липосом: 184, 602 и более 5000 нм. При обработке ультразвуком происходит стандартизация размеров наночастиц. После 1 минуты УЗ-обработки образуется 2 основные фракции липосом: 238 и 42 нм. Дальнейшее увеличение времени обработки ультразвуком приводило к образованию моногенной фракции наночастиц. Наиболее узкое распределение по размеру наблюдали при озвучивании суспензии в течение 15 минут. (Табл.1)

На следующем этапе работы определяли степень включения в липосомы инсулина и гемоглобина. Включаемость инсулина составила $57.5 \pm 2.2 \%$, включаемость гемоглобина - $33.2 \pm 2.8 \%$. (Рис.1)

Заключительным этапом работы стало определение роли гидрофобных «связей» в процессе включения инсулина. В качестве агента, разруша-

Зависимость гидродинамического диаметра липосом от режима УЗ-обработки

Время облучения	Без УЗ-обработки	1 мин	5 мин	10 мин	15 мин	20 мин
Гидродинамический диаметр, нм	184.8±72.9 602.8±162.1 5560.0±211.2	238.6±51. 42.7±6.3	172.4±33.3	180.5±43.5	173.8±12.5	164.6±50.0

ющего гидрофобные «связи», нами была выбрана мочеви́на. К раствору инсулина в натрий-фосфатном буфере добавляли мочеви́ну в концентрации 8М и измеряли степень включения инсулина по вышеописанной схеме. Включаемость этого белка резко снизилась и составила $13.1 \pm 0.5 \%$.



Рис. 1. Включение различных белков во внутреннюю полость липосом

Снижение степени включения инсулина после воздействия мочеви́ной, по-видимому, связано с разрушением гидрофобных «связей» между молекулами белка и липидов, что свидетельствует о значительной роли гидрофобных взаимодействий в процессах включения данного белка в липосомы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследований были получены липосомы из соевого лецитина. Размер синтезированных липосомальных наночастиц и степень включения в их состав различных белков соответствуют требованиям, предъявляемым к носителям лекарственных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барсуков Л.И. // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 10. С. 2-8.
2. Березов Т.Т., Яглова Н.В., Дмитриева Т.Б. // Вестник РАМН. 2004. №5. С. 42-47.
3. Ивонин А.Г., Пименов Е.В., Оборин В.А., Девришов Д.А., Копылов С.Н. // Известия Коми НЦ УрО РАН. 2012. №1. С.46-53.
4. Краснопольский Ю.М., Балабаньян В.Ю., Шоболов Д.Л., Шве́ц В.И. // Журнал Российско-

го химического общества им. Д.И. Менделеева. 2012. Т.3-4. С. 11-32.

5. Краснопольский Ю.М., Степанов А.Е., Шве́ц В.И. // Биофарм журнал. 2009. №3. С.18-29.

6. Белоусов Ю.Б. Лекарственные формы с модифицированным высвобождением и системы доставки лекарств: особенности фармакокинетики и клиническая эффективность // Москва: Литерра, 2011. 656 с.

7. Наквасина М.А., Артюхов В.Г. Основы бионанотехнологии // Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2016. 72 с.

8. Цой О.Г., Тайгулов Е.А., Иманбаева Ю.Ш. // Астана медициналык журналы. 2011. Т. 66. № 4. С. 7-12.

9. Kozłowska D., Foran P., MacMahon P. // Adv. Drug Deliv. Rev., 2009. Vol. 61. № 15. // 1402-1411.

10. Зиганшин А.У., Зиганшина Л.Е. // Казанский медицинский журнал. 2008. Т. 89. № 1. С. 1-7.

11. Григорьева М.В. Биотехнология. // 2011. Т. 4. № 2. С. 9-23.

12. Кедик С.А., Жаворонок Е.С., Седишев И.П., Панов А.В., Суслов В.В., Петрова Е.А., Сапельников М.Д., Шаталов Д.О., Ерёмин Д.В. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 2(3). С. 18-35.

13. Albu N.G., Titorencu I., Ghica M.V. // In: R. Pignatello, editor. – Biomaterials Applications for Nanomedicine. Rijeka, Croatia: InTech, 2011. pp. 333-360.

14. Glass P., Cheung E., Sitti A.M. // IEEE Transact Biomed Engineer. 2008. V. 55. № 1. pp. 2759-2767.

15. Razzacki S.Z., Thwar P.K., Yang M. // Adv Drug Deliv Rev. 2008. V. 56. № 2. pp. 186-198.

16. Sliwoski G., Kothiwale S., Meiler J., Lowe E.W. // Pharmacol Rev. 2014. V. 66. pp. 334-395.

17. Glass P., Cheung E., A.M. Sitti // IEEE Transact Biomed Engineer. – 2008. V. 55. № 1. pp. 2759-2767.

18. Dapergolas G., Gregoriadis G. // Lancet. 1976. V. 2. pp. 824-827.

19. Шилова Е.В., Артюхов В. Г., Скорбач Е.Д., Тололина М.В., Близначева Г.Н., Колтаков

И.А. // Нанотехнологии: разработка, применение: XXI век. №4. 2018. С.9-14.

20. Lowry O.H., Rosbrough N.J., Farr A.L. // J. Biol. Chem. 1951.Vol. 193. pp. 265-270.

*Воронежский государственный университет
Колтаков И.А., к.б.н., доцент кафедры биофизи-
ки и биотехнологии
E-mail: koltakov@bio.vsu.ru*

*Voronezh State University
Koltakov I.A., PhD., Associate Professor of
Biophysics and biotechnology department
E-mail: koltakov@bio.vsu.ru*

*Шилова Е.В., ассистент кафедры биофизику
и биотехнологии
E-mail: zinkovae@list.ru*

*Shilova E.V., Assistant of Biophysics and
biotechnology department
E-mail: zinkovae@list.ru*

*Бразжникова А.Н., студентка кафедры био-
физику и биотехнологии
E-mail: anastasiabraznikova85@gmail.com*

*Brazhnikova A.N., student of of Biophysics and
biotechnology department
E-mail: anastasiabraznikova85@gmail.com*

*Артыухов В.Г., д.б.н., профессор, заведующий
кафедрой биофизику и биотехнологии
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*

*Artyukhov V.G., PhD., DSci., Head of Biophysics
and biotechnology department
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*

CREATION OF LIPOSOMES FROM SOY LECITHIN FOR DRUG DELIVERY

I. A. Koltakov, E. V. Shilova*, A. N. Brazhnikova, V. G. Artyukhov

FSBEI HE "Voronezh State University"

Abstract. The creation of liposomal nanoparticles is a promising way to encapsulate drugs. Liposomal forms of medicinal substances allow to neutralize the possible negative effect of the drug on healthy tissues, contribute to its more prolonged action. There are various methods for standardizing the size of liposomes, one of the main ones is ultrasonic processing. Ultrasonic (US) processing is a simple method to reduce the size of liposomes and produce small unilamellar liposomes. The aim of this study was to develop regimes for standardizing the size of liposomes using ultrasonic treatment and to study the possibility of including protein macromolecules in the composition of the obtained liposomes. In this work, liposomal particles from phosphatidylcholine were obtained by hydration/rehydration. To create monolamellar structures and standardize the size of liposomes, they were irradiated with ultrasound for 1–20 minutes (20 kHz, 10 second pulse with a break of 3 seconds). The size of the synthesized liposomes was controlled by dynamic light scattering. It was shown that ultrasonic treatment in this mode for 15 minutes promotes the formation of liposomal particles with the narrowest size distribution (the hydrodynamic diameter of liposomes was 173.8 ± 12.5 nm). An important parameter in the preparation of liposomal particles is the proportion of drug incorporation into liposomes. In the case of passive loading of hydrophilic compounds into liposomes, they are usually dissolved in an aqueous medium used to hydrate the lipid film. Depending on the conditions of hydration and the properties of the drug, it changes from 5 to 20%, and the unloaded drug remains in the aquatic environment surrounding the vesicles. In rare cases, the passive loading of the hydrophilic preparation reaches 70%. Insulin and hemoglobin were used as model proteins included in liposomes. The protein concentration was determined by the Lowry method. Insulin inclusion was $57.5 \pm 2.2\%$, hemoglobin inclusion was $33.2 \pm 2.8\%$. With the addition of 8 M urea, the inclusion of insulin sharply decreased and amounted to $13.1 \pm 0.5\%$. An assumption was made about the significant role of hydrophobic interactions in the processes of incorporation of proteins into liposomes.

Keywords: liposomes, insulin, hemoglobin, ultrasound treatment

REFERENCES

1. Barsukov L.I., Sorosovskij obrazovatel'nyj zhurnal, 1998, № 10, pp. 2-8.
2. Berezov T.T., YAglava N.V., Dmitrieva T.B., Vestnik RAMN, 2004, №5, pp. 42–47.
3. Ivonin A.G., Pimenov E.V., Oborin V.A., Devrishov D.A., Kopylov S.N., Izvestiya Komi NC UrO RAN, 2012, №1, pp. 46-53.
4. Krasnopol'skij Yu.M., Balaban'yan V.Yu., Shobolov D.L., Shvec V.I. , ZHurnal Rossijskogo himicheskogo obshchestva im. D.I. Mendeleeva, 2012, T.3-4, pp. 11–32.
5. Krasnopol'skij Yu.M., Stepanov A.E., Shvec V.I., Biofarm zhurnal, 2009, №3, pp. 18–29.
6. Belousov Yu.B. Lekarstvennye formy s modificirovannym vysvobozhdeniem i sistemy dostavki lekarstv: osobennosti farmakokinetiki i klinicheskaya effektivnost', Moskva.: Litera, 2011. 656 p.
7. Nakvasina M.A., Artyuhov V.G. Osnovy bionanotekhnologii, Voronezh: Izdatel'skij dom VGU, 2016, 72 p.
8. Coj O.G., Tajgulov E.A., Imanbaeva Yh.SH., Astana medicinalyk zhurnaly, 2011, T. 66. № 4, pp. 7–12.
9. Kozłowska D., Foran P., MacMahon P., Adv. Drug Deliv. Rev., 2009, Vol. 61, № 15., pp. 1402–1411.
10. Ziganshin A.U., Ziganshina L.E., Kazanskij medicinskij zhurnal, 2008, T. 89, № 1, pp. 1–7.
11. Grigor'eva M.V. Biotekhnologiya, 2011, T. 4. № 2, pp. 9–23.
12. Kedik S.A., ZHavoronok E.S., Sedishev I.P., Panov A.V., Suslov V.V., Petrova E.A., Sapel'nikov M.D., SHatalov D.O., Eryomin D.V., Razrabotka i registraciya lekarstvennyh sredstv, 2013, № 2(3), pp. 18–35.
13. Albu N.G., Titorencu I., Ghica M.V., In: R. Pignatello, editor. – Biomaterials Applications for Nanomedicine. Rijeka, Croatia: InTech, 2011. pp. 333–360.
14. Glass P., Cheung E., Sitti A.M., IEEE Transact Biomed Engineer, 2008, V. 55. № 1, pp. 2759–2767.
15. Razzacki S.Z., Thwar P.K., Yang M., Adv Drug Deliv Rev., 2008, V. 56. № 2, pp. 186–198.
16. Sliwoski G., Kothiwale S., Meiler J., Lowe E.W., Pharmacol Rev., 2014, V. 66., pp. 334–395.
17. Glass P., Cheung E., A.M. Sitti, IEEE Transact Biomed Engineer., 2008, V. 55, № 1, pp. 2759–2767.
18. Dapergolas G., Gregoriadis G. , Lancet, 1976, V. 2, pp. 824-827.
19. Shilova E.V., Artyuhov V. G., Skorbach E.D., Tololina M.V., Bliznecova G.N., Koltakov I.A., Nanotekhnologii: razrabotka, primenenie: XXI vek, №4. 2018, pp. 9-14.
20. Lowry O.H., Rosbrough N.J., Farr A.L., J. Biol. Chem, 1951, Vol. 193, pp. 265-270.