

Liposomi kao nosači lijekova: strukturalna svojstva i klasifikacija

Vanić, Željka

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik**, 2012, 68, 391 - 400

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:489459>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Liposomi kao nosači lijekova: strukturna svojstva i klasifikacija

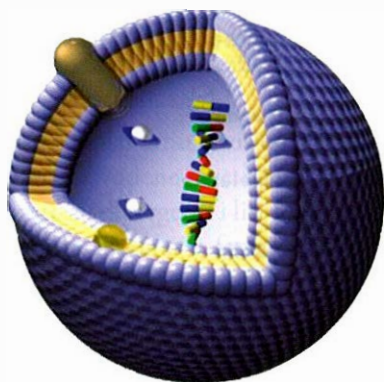
ŽELJKA VANIĆ

Zavod za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu

UVOD

Terapijski sustavi koji će omogućiti kontinuirano oslobađanje lijeka ili ciljano djelovanje lijeka na oboljelom mjestu u organizmu od velikog su medicinskog značenja. Njihovom primjenom poboljšala bi se postojeća farmakokinetička svojstva lijeka, promijenio njegov terapijski indeks i osigurala konstantna, željena koncentracija lijeka u krvi ili na mjestu djelovanja kroz duži vremenski period. Time bi se značajno smanjila nusdjelovanja, toksičnost i učestalost doziranja, čime bi pripravak bio prikladniji za bolesnika.

Navedene učinke moguće je postići uklapanjem lijeka u odgovarajuće nosače poput mikrokapsula, mikrosfera, nanosfera, micela, polimernih prolijekova, virosoma, kubosoma, nanofibrila te u različite lipidne vezikule među kojima istaknuto mjesto zauzimaju liposomi (1). Riječ je o sferičnim fosfolipidnim tverevinama u kojima je unutarnja, vodena faza obavijena s jednom ili više koncentrično položenih fosfolipidnih membrana. Promjer im se može kretati od 20-ak nm do 10-ak μm . Njihovo otkriće vezano je uz Banghama koji je 1965. opisao pojavu da tekući kristali lecitina u kontaktu s vodom formiraju tverevine veoma slične biološkim membranama (2). Premda u prvo vrijeme korišteni kao modelne stanične membrane, ubrzo se počinju istraživati kao nosači lijekova (3). Naime, strukturna svojstva liposoma omogućuju uklapanje lijekova različitih fizičko-kemijskih svojstava, kao i makromolekula poput proteina (slika 1.).



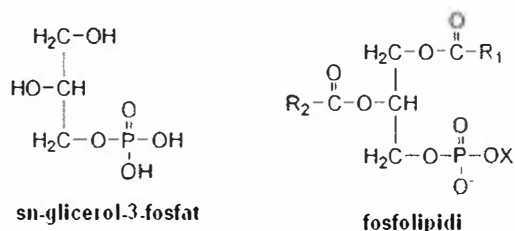
Slika 1. Strukturni prikaz liposoma. Hidrofilni lijekovi (aktivne tvari) su uklopljeni u unutarnju vodenu fazu, lipofilni su otopljeni u fosfolipidnom dvosloju, a makromolekule (proteini) se ugrađuju kroz dvosloj. (4)

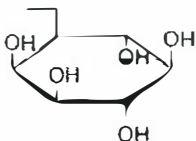
Zbog svoje sličnosti s biološkim membranama, neimunogenosti i biozgradljivosti, u potpunosti su fiziološki prihvatljivi što im osigurava primjenu u različitim terapijskim područjima: infektivna oboljenja (virusna, bakterijska, gljivična, parazitska), dijagnostika, hormonska terapija, onkologija, stimulacija imunološkog odgovora, vakcinacija itd.. Novija *in vivo* istraživanja upućuju na mogućnost ostvarivanja ciljane terapije (lijek se iz liposoma oslobađa na točno određenom mjestu u organizmu), a zadnjih je godina veliki interes za primjenom liposoma u genskoj terapiji (5).

Brojne studije na području primjene liposoma kao nosača lijekova rezultirale su komercijalno dostupnim (registriranim) pripravcima liposoma, a mnogi su u fazi kliničkih ispitivanja i postupku registracije (6).

SOJSTVA LIPOSOMA

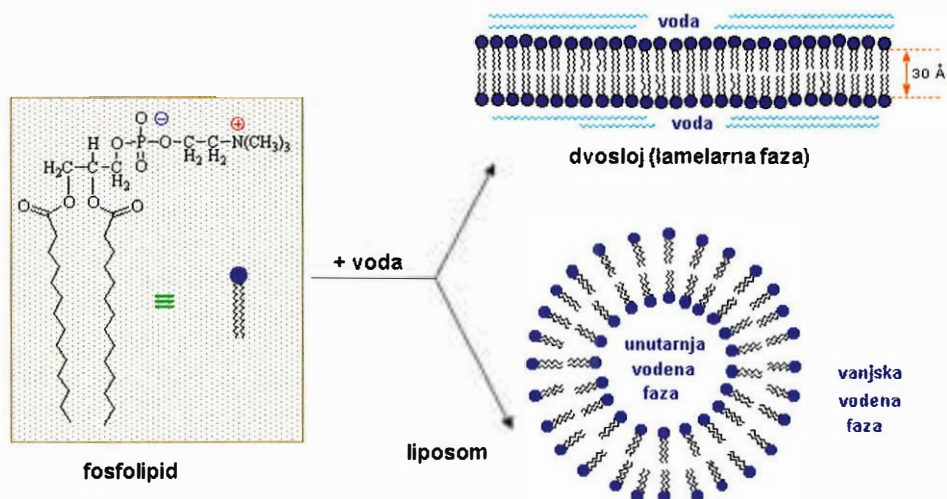
Osnovnu građevnu jedinicu liposoma čine fosfolipidi. Radi se o amfifilnim molekulama, diesterima fosfatne kiseline, koji su s jedne strane esterificirani derivatom sfingozina ili glicerola, a s druge kolinom, etanolaminom, serinom, inozitolom ili glicerolom (slika 2.). U ovojnici liposoma fosfolipidi su složeni u obliku dvosloja,



| X-OH | X | fosfolipid |
|------------|---|----------------------|
| voda | -H | fosfatidna kiselina |
| etanolamin | -CH ₂ CH ₂ NH ₃ ⁺ | fosfatidiletanolamin |
| kolin | -CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₃ ⁺ | fosfatidilkolin |
| inozitol |  | fosfatidilinozitol |
| glicerol | -CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH | fosfatidilglicerol |

Slika 2. Strukturni prikaz različitih fosfolipida (7)

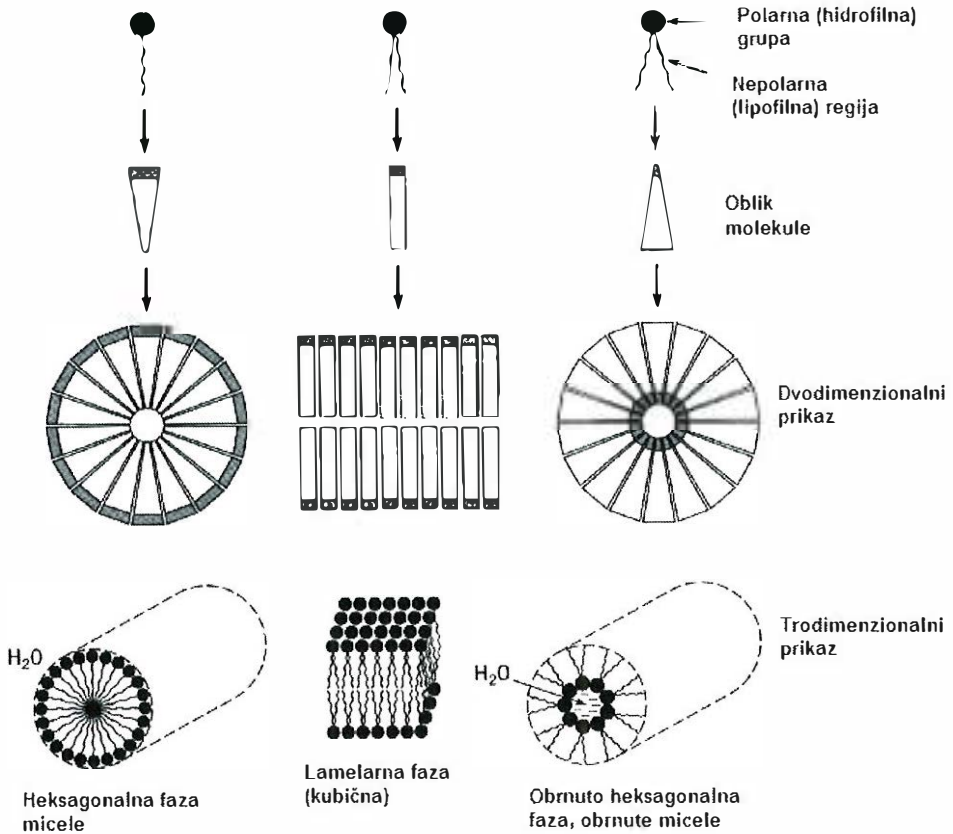
pri čemu su polarne, hidrofilne »glave« orijentirane prema vanjskoj i unutarnjoj vodenoj fazi zaklanjajući pritom nepolarne, hidrofobne »repove« (lanci masnih kiselina) jedan prema drugome (slika 3.). U neutralnom pH području fosfolipidi mogu biti u obliku »zwitter« iona ili su nabijeni negativno. Zbog toga se i klasificiraju u neutralne (fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin) te negativno nabijene: fosfatidilglicerol, fosfatidilserin, fosfatidilinozitol i fosfatidna kiselina (slika 2.) (7).



Slika 3. Shematski prikaz formiranja liposoma (8)

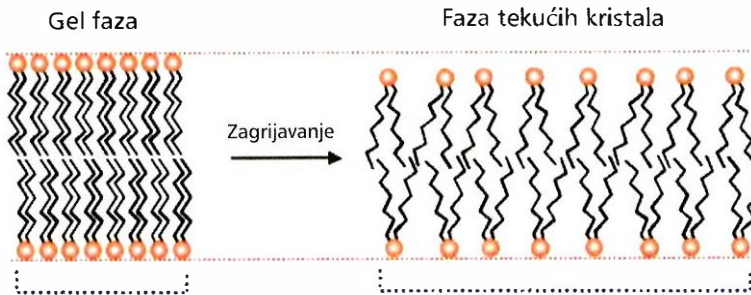
Najčešće se za pripremu liposoma upotrebljava lecitin, koji je zapravo smjesa fosfolipida s najvećim udjelom fosfatidilkolina u kojima su lanci masnih kiselina različite duljine i stupnja zasićenosti. Prirodni se lecitin najčešće dobiva ekstrakcijom i pročišćavanjem iz jaja i soje. Karakteristično je da lecitin iz soje sadrži veći udio nezasićenih masnih kiselina od onog dobivenog iz žutanjaka jaja. Znatno su kvalitetniji, zbog točno definiranog sastava, sintetski proizvedeni fosfolipidi (tablica 1.) (7).

Fosfatidilkolin je netopljiv u vodi i pritom poprima planarnu dvoslojnu strukturu da bi se minimalizirale neželjene interakcije između vodene faze i hidrofobnih lanaca. Nasuprot tome, druge amfifilne molekule kao što su detergensi i lizofosfolipidi formiraju micelle. To je stoga što dvostruki lanci masnih kiselina u fosfatidilkolinu daju molekuli cilindričan oblik prikladan za formiranje dvosloja, za razliku od prije spomenutih detergensa čija molekula ima oblik obrnutog konusa pogodnog za oblikovanje heksagonalne faze, micela (slika 4.). Štoviše, određene amfifilne molekule kao što je npr. fosfatidiletanolamin, imaju formu konusa te u vodenom okruženju stvaraju obrnuto heksagonalnu fazu (obrnute micelle). Takva pojava fosfolipida da u vodenom okruženju poprimaju različite strukture i faze označava se lipidnim polimorfizmom i od velike je važnosti u biološkim procesima, ali i u dizajniranju terapijskih sustava kontroliranog otpuštanja uklopljenog lijeka (9).



Slika 4. Molekularni oblik i samoorganiziranje amfifilnih molekula (9).

Ovisno o temperaturi, fosfolipidne membrane postoje u različitim fazama; visokoorganiziranoj, čvrstoj ili gel fazi te fazi tekućih kristala (slika 5.). Temperatura na kojoj se odvija prijelaz iz gel faze u fazu tekućih kristala označava se temperaturom faznog prijelaza (T_c) i umnogome ovisi o duljini i stupnju zasićenosti lanaca masnih kiselina u molekulama fosfolipida (10).



Slika 5. Shematski prikaz prijelaza fosfolipidne membrane iz gel u fazu tekućih kristala (11)

Zbog heterogenog i kompleksnog sastava, fosfolipidi staničnih membrana imaju široku fazu prijelaza (ispod fiziološke temperature), dok je u sintetskih ta faza veoma uska zbog točno definiranog sastava (tablica 1.). Pokazalo se da povećanjem duljine lanaca masnih kiselina i stupnja njihove zasićenosti T_c poprima veće vrijednosti (12).

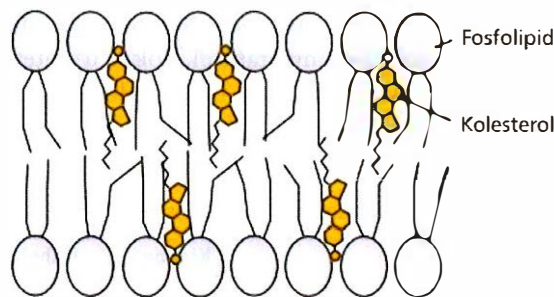
Tablica 1. Fizičko-kemijska svojstva fosfolipida (12)

| Fosfolipid | Kratica | Naboja | T_c (°C) |
|-------------------------------------|---------|--------|------------|
| Fosfatidilkolin (lecitin) | PC | 0 | -15 do -7 |
| Dilauroil-fosfatidilkolin (C12:●) | DLPC | 0 | -1,8 |
| Dimiristoil-fosfatidilkolin (C14:●) | DMPC | 0 | 23 |
| Dipalmitoil-fosfatidilkolin (C16:●) | DPPC | 0 | 41 |
| Distearoil-fosfatidilkolin (C18:0) | DSPC | 0 | 55 |
| Dioleil-fosfatidilkolin (C18:1) | DOPC | 0 | -22 |
| Dilauroil-fosfatidilglicerol | DLPG | -1 | 4 |
| Dimiristoil-fosfatidilglicerol | DMPG | -1 | 23 |
| Dipalmitoil-fosfatidilglicerol | DPPG | -1 | 41 |
| Distearoil-fosfatidilglicerol | DSPG | -1 | 55 |
| Dioleil-fosfatidilglicerol | DOPG | -1 | -18 |
| Dimiristoil-fosfatidna kiselina | DMPA | -1b | 51 |
| Dimiristoil-fosfatidna kiselina | DMPA | -2c | 45 |
| Dipalmitoil-fosfatidna kiselina | DPPA | -1d | 67 |
| Dipalmitoil-fosfatidna kiselina | DPPA | -2e | 58 |
| Dimiristoil-fosfatidiletanolamin | DMPE | - | 50 |
| Dipalmitoil-fosfatidiletanolamin | DPPE | - | 60 |
| Dimiristoilfosfatidilserin | DPPS | - | 38 |
| Dipalmitoil-fosfatidilserin | DPPS | - | 51 |
| Fosfatidilserin | PS | - | 6-8 |

^a pH 7,0; ^b pH 6,0; ^c pH 9,0; ^d pH 6,5; ^e pH 9,1

Osim fosfolipida, ovojnica liposoma često sadrži kolesterol (slika 6.). Njegova je uloga slična kao i u biološkim membranama; ugrađuje se u dvosloj između molekula fosfolipida te povećava njegovu čvrstoću (rigidnost) uslijed smanjene slobode kretanja fosfolipidnih molekula. U manjim količinama kolesterol nema utjecaja na temperaturu faznog prijelaza fosfolipidne membrane, ali ako je prisutan u velikom udjelu (50 mol %) može ju prekriti (7).

Poznavanje T_c i s tim u vezi fluidnosti membrane važno je pri proizvodnji i istraživanju terapijskih sustava zasnovanih na liposomima. Naime, fluidnost ili rigidnost membrane utječe na svojstva liposoma kao što su permeabilnost, fuzija, agregacija, vezanje za proteine plazme. Svi ti parametri utječu na stabilnost liposoma i njihovo ponašanje u biološkim fluidima. Primjerice, što je T_c niža, fluidnost membrane je



Slika 6. Shematski prikaz ugradnje kolesterola u fosfolipidni dvosloj (13)

veća i ona je permeabilnija za uklopljeni sadržaj, čime je stabilnost liposoma, kako fizička, tako i ona nakon *in vivo* primjene, smanjena (7).

Znači, odabirom fosfolipida koji čine ovojnici liposoma moguće je utjecati na svojstva liposoma. Oni dakle određuju čvrstoću ili fluidnost membrane s jedne strane, a s druge naboj na površini o kome ovisi stabilnost liposoma *in vivo*, ali i fizička stabilnost liposomskih pripravaka.

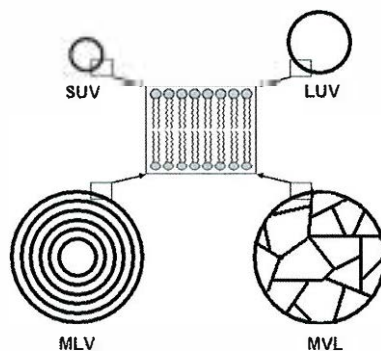
Strukturalna obilježja liposoma razlog su da se u njih mogu uklapati različiti lijekovi: lipofilni u ovojnici (fosfolipidni dvosloj), hidrofilni u unutarnju vodenu jezgru te amfifilni između vodene i lipidne regije. Uspješnost uklapanja lijekova u liposome varira ovisno o fizičko-kemijskim svojstvima lijeka. Općenito je pravilo da se lipofilni lijekovi uklapaju u visokom postotku (do 100 %), a problem niskog uklapanja svojstven je hidrofilnim lijekovima (9).

KLASIFIKACIJA LIPOSOMA

Liposomi se mogu klasificirati prema veličini i broju fosfolipidnih dvoslojeva (7) te prema strukturalnim svojstvima i načinu oslobađanja uklopljenog sadržaja (5,14).

Morfologiju liposoma većinom određuje postupak pripreme, a manjim dijelom fosfolipidni sastav. Prema veličini i broju fosfolipidnih dvoslojeva, razlikuju se skupine unilamelarnih, multilamelarnih, oligolamelarnih i multivezikularnih liposoma (slika 7.).

Unilamelarni liposomi (*unilamellar vesicles*, UV) sadrže jednu fosfolipidnu ovojnici, a prema veličini se dijele na: a) male unilamelarne liposome (*small unilamellar vesicles*, SUV), promjera 20–100 nm; b) srednje-velike unilamelarne liposome (*medium sized unilamellar vesicles*, MUV) promjera većeg od 100 nm; c) velike unilamelarne liposome (*large unilamellar*



Slika 7. Klasifikacija liposoma prema veličini i broju fosfolipidnih dvoslojeva (15)

vesicles, LUV) promjera 100–1000 nm te veoma velike unilamelarne liposome (*giant unilamellar vesicles*, GUV) promjera većeg od 1000 nm.

Oligolamelarni liposomi (*oligolamellar vesicles*, OLV) sadrže nekoliko koncentrično položenih fosfolipidnih dvoslojeva između kojih su vodeni prostori, dok multilamelarne liposome (*multilamellar vesicles*, MLV) karakterizira postojanje velikog broja koncentrično postavljenih fosfolipidnih dvoslojeva, pri čemu volumen vodene faze može varirati: najveći unutar središnje ovojnice, jednak ili različit između pojedinih ovojnica te najmanji u središnjoj vodenoj jezgri. Multivezikularne liposome (*multivesicular liposomes*, MVL) čini mnogo manjih vezikula nasumično razmještenih (uklopljenih) unutar velikog liposoma pri čemu dvoslojevi mogu formirati trodimenzionalnu mrežu komora rezultirajući velikim sferičnim strukturama nalik na pjenu. Veličina im se kreće od 1000–2000 nm (7).

Prema drugom načinu klasifikacije razlikuju se konvencionalni, sterički stabilizirani, imunoliposomi i polimorfni liposomi (slika 8.) (5, 14).

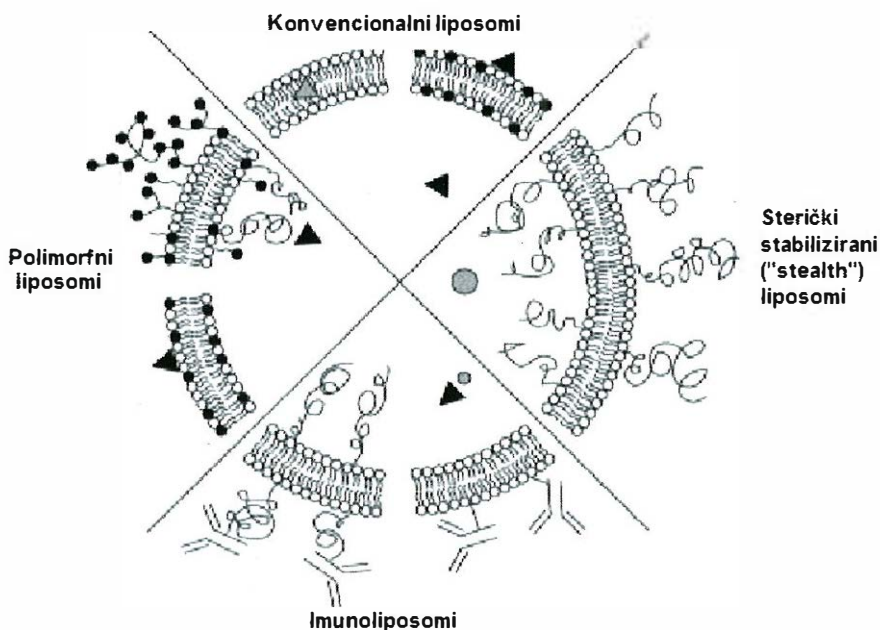
Konvencionalni liposomi su načinjeni iz fosfolipida neutralnog ili negativnog naboja na površini, a mogu sadržavati i kolesterol. Obilježava ih nespecifična reaktivnost prema okruženju u kojem se nalaze. Nakon intravenske primjene kratko se zadržavaju u cirkulaciji. Budući da se akumuliraju u stanicama retikuloendotelnog sustava i makrofagima prikladni su u liječenju infektivnih oboljenja, vakcinaciji i dijagnostici oboljenja organa u kojima se nakupljaju (jetra, slezena). Primjenjuju se i kao nosači lijekova u terapijskim sustavima za lokalnu primjenu.

Sterički stabilizirani, dugo-cirkulirajući (tzv. *stealth*) liposomi karakterizirani su postojanjem kovalentno vezanih hidrofilnih polimera (najčešće polietilenglikola) za fosfolipidnu membranu. Na taj je način površina liposoma zaštićena od opsonina i lipoproteina u krvi koji su odgovorni za njihovo prepoznavanje od strane makrofaga i stanica retikuloendotelnog sustava. U odnosu na konvencionalne liposome, sterički stabilizirani liposomi dugo se zadržavaju u cirkulaciji čime je omogućena isporuka uklopljenog lijeka na željeno mjesto djelovanja. Ako se promatra njihova reaktivnost uzorkovana promjenama u okruženju u kojem se nalaze, može se konstatirati da su *stealth* liposomi relativno inertni, nereaktivni. Vrijeme polueliminacije tih liposoma je značajno povećano i može iznositi čak do 48 sati, za razliku od konvencionalnih (svega nekoliko sati). Sposobnost ekstravazacije *stealth* liposoma na mjestima gdje je povećana permeabilnost stijenki krvnih žila i kapilara (upalna, infektivna i tumorska područja) ključni je parametar koji im omogućuje primjenu u pasivnoj ciljanoj terapiji. Danas na tržištu postoje registrirani pripravci sterički stabiliziranih liposoma s antitumorskim lijekovima (Doxil, Caelix).

Imunoliposomi su zapravo konvencionalni ili dugo-cirkulirajući liposomi za čiju su ovojnicu, direktno ili posredno preko polimera, vezana specifična antitijela. Takva strukturna svojstva omogućuju im prepoznavanje od strane odgovarajućih

stanica preko specifičnih antigena čime se može osigurati ciljano djelovanje na točno određenim mjestima u organizmu (aktivna ciljana terapija).

Skupina polimorfnih liposoma obuhvaća, u usporedbi s već navedenima, novije generacije liposoma i u odnosu na njih su vrlo reaktivni prema okruženju. Tu spadaju: a) pH-osjetljivi liposomi koji uslijed pada pH vrijednosti okruženja u kojem se nalaze, točnije u endosomu stanice podliježu agregaciji, fuziji i destabilizaciji, te oslobađaju uklopljeni sadržaj u citoplazmu pri čemu je izbjegnuta njegova razgradnja u lizosomu; b) temperaturno-osjetljivi liposomi koji uslijed promjene tj. porasta temperature u okruženju oslobađaju uklopljeni sadržaj te c) kationski liposomi koji u interakciji s nukleinskim kiselinama mijenjaju svoju strukturu, nastaju lipid-DNA kompleksi (lipopleksi) koji fuzijom s plazmatskom membranom ulaze u stanicu. Kod skupine polimorfnih liposoma iskorišteno je svojstvo lipidnog polimorfizma, tj. da se različitim podražajima iz okruženja u kojem se liposomi nalaze (npr. pad pH unutar endosoma ili porast tjelesne temperature) uzrokuju promjene molekularnog oblika fosfolipida ili neke druge membranske komponente koja dovodi do promjene integriteta, tj. destabilizacije ovojnice i oslobađanja uklopljenog lijeka na željenom mjestu djelovanja (ciljani učinak) (5, 6, 14).



Slika 8. Klasifikacija liposoma prema strukturalnim svojstvima i načinu oslobađanja uklopljenog sadržaja (14)

Liposomes as drug carriers: structure properties and classification

by Ž. Vanić

Abstract

Liposomes are colloidal particles in which a phospholipid bilayer membrane, composed from self-assembled amphiphilic molecules encapsulates part of the aqueous phase in which they are dispersed. Since their discovery in the mid-1960s, they were first used to study biological membranes. Due to their biodegradability and biocompatibility, today, liposomes are useful system for the delivery or targeting of drugs to specific sites in the body. Liposomes are characterized by their phospholipid composition, particle size, number of lamellae, and inner/outer aqueous phases, all of which dictate their stability and interaction characteristics. They are able to incorporate almost any drug regardless of solubility, or to carry on their surface cell-specific ligands. Therefore, liposomes have the potential to be tailored in a variety of ways to ensure the production of formulations that are optimal for clinical use. Morphologically, we distinguish between small, medium-sized, large and giant unilamellar, oligo- or multi-lamellar, as well as multivesicular liposomes. With respect to interaction properties there are several types of liposomes: conventional liposomes which are characterized by a nonspecific reactivity of the milieu, sterically stabilized liposomes that are relatively inert and therefore nonreactive to the environment, immunoliposomes and polymorphic liposomes which are very reactive towards specific agents.

Literatura – References

1. Torchilin VP. Nanoparticles as drug carriers. London: Imperial College Press, 2006.
2. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol.* 1965; 13:238–252.
3. Gregoriadis G. The carrier potential of liposomes in biology and medicine. *N Engl J Med.* 1976; 295:704–710.
4. <http://avantilipids.com>, datum pristupa: 28. 02. 2012.
5. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4:145–160.
6. Lasic DD., Papahadjopoulos D. Medical applications of liposomes. Amsterdam-New York-Oxford-Tokyo: Elsevier, 1998.
7. New RRC. Liposomes a practical approach. Oxford-New York-Tokyo: IRL Press, 1989.
8. <http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/lipids.htm>, datum pristupa: 28. 02. 2012.
9. Kirby C, Gregoriadis G. Liposomes In: Mathiowith E. (Ed.) Encyclopedia of Controlled Drug Delivery. New York-Chichester-Weinheim-Brisbane-Singapore-Toronto: Wiley, 1999:461–492.
10. Lasic DD. Liposomes: from physics to applications. Amsterdam-London-New York-Tokyo: Elsevier, 1993.
11. www.mikcblaber.org/oldwine/BCH4053/Lecture14/Lecture14.htm, datum pristupa: 01. 03. 2012.

12. Szoka F, Papahadjopoulos D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Ann Rev Biophys Bioeng.* 1980; 9:467–508.
13. <http://www.erin.utoronto.ca/~w3bio315/lecture2.htm>, datum pristupa: 01.03. 2012.
14. Storm G, Crommelin DJA. Liposomes: quo vadis? *Pharm Sci Technol Today.* 1998;1: 19–31.
15. <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1243>, datum pristupa: 28. 02. 2012.

Primljeno 8. ožujka 2012.