

ЛИПИДНИ МОДЕЛНИ СИСТЕМИ В МЕДИЦИНАТА

РОСИЦА МАРИНОВА, ВАЛЕРИ КОЧЕВ

*Катедра „Атомна физика“, група „Медицинска физика“
Физически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“*

Росица Маринова, Валери Кочев. ЛИПИДНИ МОДЕЛНИ СИСТЕМИ В МЕДИЦИНАТА

В работата е направен преглед на някои по-важни липидни моделни системи, използвани за доставяне на лекарствени средства в организма. Разгледани са техните основни елементи, начините на получаване и принципите на действие. Изяснени са от биофизична гледна точка процесите на липидната самосборка и стабилността на агрегатите. Развитието на този тип моделни системи е проследено във връзка с фармакологичното им приложение. Дискутирани са проблемите, възникващи поради разграждането на лекарствените препарати в кръвообращението и намаляването на ефективността им. Показани са някои възможности за прилагане на липидни носещи системи при третиране на тумори и гъбични инфекции. Коментирани са някои бъдещи перспективи за развитие.

Rositsa Marinova, Valery Kochev. LIPID MODEL SYSTEMS IN MEDICINE

This work is devoted to drug delivery systems based on lipid membranes analogs. General elements, methods of formation and some features of these systems are disclosed. The processes of lipid self-association and aggregate stability are clarified from biophysical viewpoint. The problems toward the realization of P.Ehrlich's idea for „magic bullets“ are briefly discussed. Some major elements and concepts of operation of lipid drug delivery systems are regarded. Examples of lipid model systems for treating of tumors and fungal infections are given. Some features concerning construction and future implementation of these systems are discussed.

Keywords: lipid model systems, drug delivery, membrane analogs, lipid self-association, lipid phases

PACS numbers: 87.14.Cc, 87.16.Dg

За контакти: Росица Маринова, Валери Кочев, Катедра „Атомна физика“, Физически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“, бул. „Джеймс Баучер“, 5, София 1164, тел.: +359 2 8161317, E-mail: rosie.marinova@gmail.com

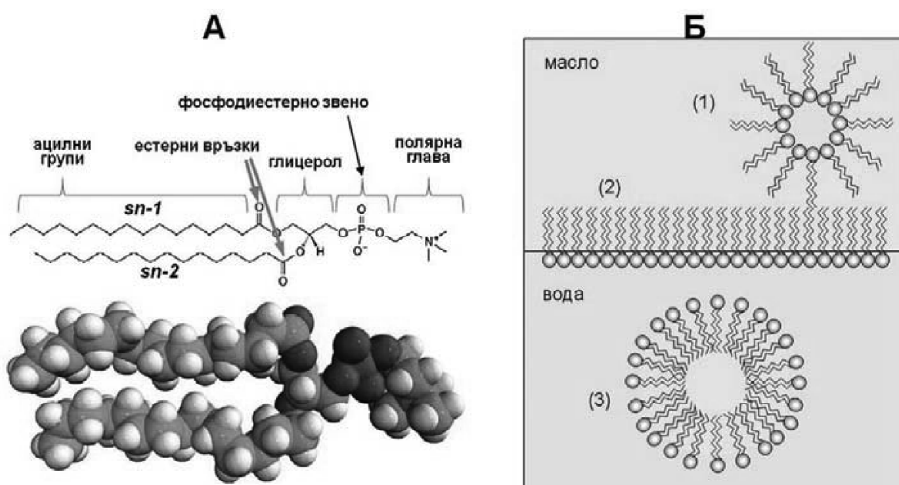
1. ВЪВЕДЕНИЕ.

ДВИЖЕЩИ СИЛИ НА ЛИПИДНАТА САМОАСОЦИАЦИЯ. ПАРАМЕТЪР НА ОПАКОВАНЕ. ГЛАВНИ ТИПОВЕ МЕЗОФАЗИ

Липидите, една от основните съставки на биологичните мембрани, в последните десетилетия много усилено привличат вниманието на все по-широк кръг специалисти със способността си за самоасоциация. Именно това тяхно свойство е в основата на двойния молекулен слой, който те изграждат, за да служи като гръбнак на нативните мембрани. Към това „скеле“ са прикачени множество полипептидни видове, отговорни за една плеяда от извънредно важни клетъчни дейности [7, 3, 12].

За изработването на адекватни представи, относно морфологията и поведението на различните липидни архитектури при хидратация, очевидно от особена важност е познаването на основните термодинамични принципи, от които зависи тяхното структуриране и стабилност. Химичният състав на липидите е отговорен за специфичното им държане спрямо различните разтворители. Техните молекули притежават както хидрофилни области (в зоната на полярните глави), така и хидрофобни участъци (по протежение на ацилните вериги). Такива вещества, наречени амфипатични, проявяват афинитет и към полярни, и към неполярни фази, като разпределението им между тях се определя от съотношението на различните части в молекулата, което понякога се изразява с т.нар. *число на хидрофилно-липофилния баланс* (англ. hydrophilicity lipophilicity balance, HLB, [38]). Това обстоятелство, дължащо се на *хидрофобния ефект*, напълно задава и ориентацията им – с главите към водното обкръжение и с въглеродородните опашки към олеофилната фаза. Идеята за хидрофобния ефект е лансирана за пръв път от Ленгмюр (Irving Langmuir, 1881–1957) и по-късно е доразвита от Валтер Кауцман [48], за да се стигне до общоприетото мнение, че това е основният фактор на амфифилната асоциация [80, 14].

В хидратирано състояние липидите приемат много разнообразна микро- и макроскопична подредба. Дори двукомпонентните системи от вода и само един чист липид са способни да образуват повече от един вид структури. Отдавна е известно, че във водни разтвори те са склонни да се самоасоциират като мицели, бимолекулни слоеве, везикули и т.н. По същите причини те изграждат монослоеви на граничната повърхност между две среди (фиг. 1Б). Този полиморфизъм [36] дълги години е обект на особен интерес и изследването на много водно-липидни системи позволи да се идентифицират десетки фази, чиято специфична организация бе точно определена [58, 72, 56].



Фиг. 1. (А) Молекулен модел на най-често срещания фосфолипид – дипалмитоил-фосфатидилхолин, DPPC. (Б) Схематично представяне на ориентацията на липидните молекули в интерфейса между водната и маслената фаза: 1) обърнат мицел; 2) монослой; 3) нормален мицел

Впечатляващо е, че такова многообразие от форми не се среща за никак друго химично съединение и още от самото начало то бе свързано с физиологичните процеси, в които участват биологичните мембрани. Независимо че в тази насока все още много въпроси очакват своето изясняване, категорично се оформя мнението, че мембранните липиди не са само пасивни структурни елементи. Преходите от една към друга фаза най-вероятно осигуряват адаптация към промените във външните условия, така че да се запази нормалната функционална активност на мембраните и свързаните с тях клетъчни процеси.

В основни линии самосборката на амфифилите в строго подредени структури се управлява от два типа взаимодействия – хидрофобно *привличане* на границата въглеродородни опашки/вода и хидрофилно *отблъскване* между полярните глави (електростатично и/или дължащо се на стерични ефекти). Първото тласка молекулите към асоцииране заради хидрофобния ефект, докато второто изисква по-близък контакт с водата. Така естествено изплува концепцията за „*противодействащите сили*“ [80] – едните, стремящи се да намалят, а другите да увеличат интерфейсната повърхност *a*, падаща се на една молекула. Силите на привличане произхождат от междофазовото напрежение γ , действащо върху граничната повърхност хидрофобна/хидрофилна зона. То представлява интерфейсната свободна енергия за единица площ [2] (която за повечето въглеродороди е от порядъка на 20–50

mJ/m²) така, че тези сили могат да бъдат зададени чрез γ и техният принос към химичния потенциал е пропорционален на ефективната площ a на молекулата. Поради различните си съставки силите на отблъскване са твърде сложни за експлицитно формулиране. В първо приближение обаче те се представят като обратно пропорционални на площта a и в крайна сметка свободната енергия μ за една молекула в агрегат се дава с израза [45, 4, 59]

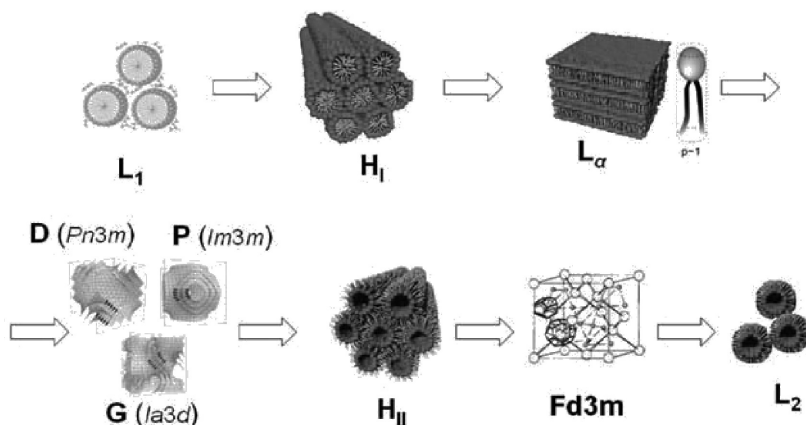
$$\mu = \gamma a + K/a,$$

който има минимум за някаква оптимална площ $a_0 = (K/\gamma)^{1/2}$, съответстваща на механичното равновесие.

Така или иначе, молекулната опаковка и близкият порядък в пространствената организация на агрегатите ще се определят преди всичко от специфичната форма на амфифилите, която е отразена в трите молекулни атрибута – оптимална площ a_0 на главата, обем v на въглеродородните вериги (които се предполагат в „течно“ състояние) и критична дължина l_c . Последната величина е полуемпирична и дава представа за границата, до която хидрофобните опашки могат да се считат за флуидоподобни. Критичната дължина на веригите все пак е по-малка, но от същия порядък, както максималната им дължина. Споменатите характеристики позволяват да се въведе един безразмерен параметър, известен като *параметър на опаковане* – $v/a_0 l_c$, с помощта на който може да се прогнозира видът на агрегатите [44].

Над дадена критична концентрация на мицелообразуване (англ. critical micellar concentration, СМС), разтворените във водна среда липиди спонтанно се самоасоциират, образувайки дисперсна фаза. Формата, големината и разпределението на агрегатите в нея зависят от потенциала на междумолекулните взаимодействия, който се определя от структурата на участващите химични видове. В зависимост от техния състав (т.е. параметъра на опаковане $v/a_0 l_c$) и концентрация, както и от условията на околната среда (рН, температура, осмотично налягане, йонна сила и т.н.), хидратираните липиди могат да диспергират в *изотропна течна фаза* (англ. fluid isotropic, FI phase [32]) или да се обособят в няколко главни типа лиотропни мезофази [52].

Класификацията на тези фази се базира на следните техни главни свойства – организация от далечен порядък (т.е. вид кристална решетка, 1D, 2D или 3D периодична); състояние на веригите (течно, произволно ориентирани или гел, опънати плътно подредени); кривина на липидния слой (нормален или обърнат).

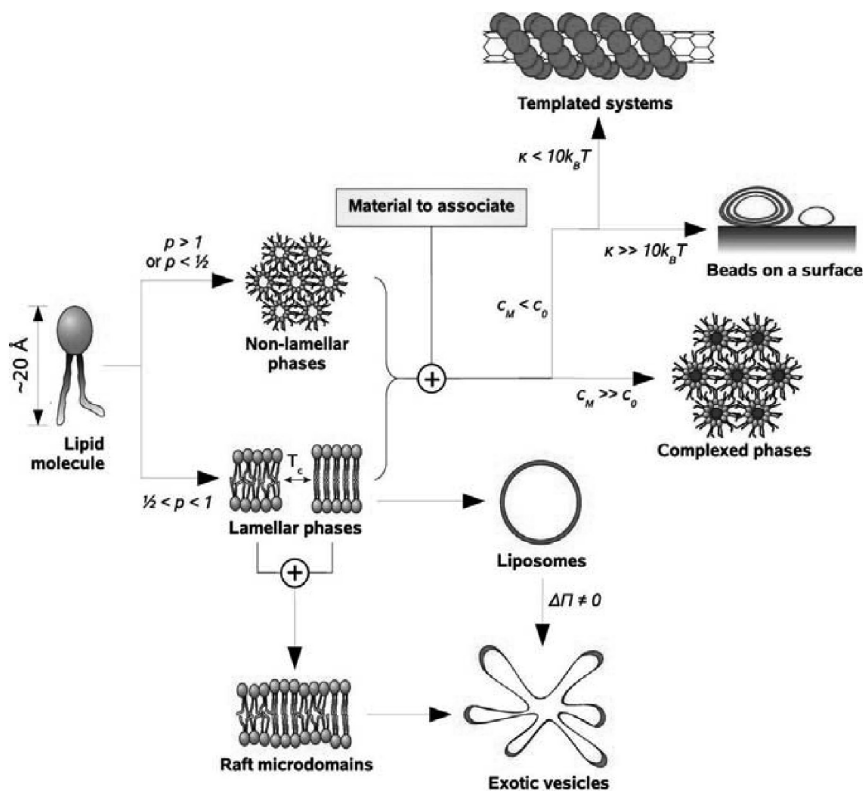


Фиг. 2. Схематично представяне на основните липидни фази, които се появяват в реда на нарастване (отляво-надясно) на параметъра на опаковане: нормални мицели L_1 ; нормална хексагонална фаза H_I ; плоска течна ламеларна фаза L_α ; трите биконтинуални кубични фази – G , D и P (пространствени групи $Ia3d$, $Pn3m$ и $Im3m$); обърнатата хексагонална фаза H_{II} ; дискретна кубична фаза, съставена от мицели (група $Fd3m$) и обеман разтвор на обратни мицели L_2 [74, 75, 60]

На фиг. 2 са показани главните липидни фази при нарастване на параметъра на опаковане. Една по-подробна класификация е дадена в обзора на Седон и Темплър [73].

2. ЛИПИДНИ МОДЕЛНИ СИСТЕМИ – СТРУКТУРА И ПРИЛОЖЕНИЕ

Чрез параметъра на опаковане една обобщена, макар и повърхностна, класификация на липидните моделни системи (ЛМС) може да бъде дадена въз основа на макроскопичната форма, която заемат. По този признак те се разделят на *плоски* и *изкривени*. Към вторите освен сферичните могат да се причислят и разнообразните биконтинуални липидни кубични фази [73, 53, 54], както и екзотичните везикули [85]. Освен това друга категоризация на ЛМС се базира на условията, в които се намират – дали са в свободно състояние, или в контакт с твърдотелен субстрат. За целите на нашето разглеждане обаче сме се ограничили само с първия тип системи, тъй като те главно са от интерес за доставката на лекарствени средства в организма.



Фиг. 3. Общ преглед на структурите, образуващи се при самоасоциацията на липидните моделни системи ЛМС в различни условия. Физични фактори, от които зависи архитектурата на ЛМС: p е параметър на опаковане; c_0 – спонтанна (вътрешна) кривина; k – средна кривина, задаваща се като $k = \frac{1}{2}(c_1 + c_2) = \frac{1}{2}(1/R_1 + 1/R_2)$; T_c – критична температура на фазов преход; $\Delta\Pi$ – разлика в осмотичното налягане; c_M – локална кривина на материала, свързан с липидите [81]

Схемата, показана на фиг. 3, илюстрира разнообразието, сложния строеж и широкия пространствен мащаб на изява на ЛМС в зависимост от основните физични фактори, с които те са свързани. Както казахме, параметърът на опаковане p (т.е. формата на молекулата) задава вида на фазата, в която се намират липидите. При p , по-голям от единица или по-малък от $1/2$, системите са склонни да образуват неламеларни фази (напр. хексагонални или кубични), докато при $1/2 < p < 1$ предпочитани са плоските бислойни фази в гелно или течно-кристално състояние, съобразно с критичната температура за преход T_c . Смесването на липиди с различно фазово състояние води до тяхната сегрегация и появата на обособени латерални области, т.нар. *липидни салове* (англ. lipid rafts). На по-високо пространствено ниво (от порядъка на микрометри) ламеларните фази могат спонтанно да формират затворени образу-

вания – сферични липозоми или везикули с екзотична форма, под влияние на външното осмотично налягане. По-надолу ще се опитаме да изложим примери на някои характерни представители от различните типове ЛМС. Доколкото идеята на работата е да даде представа за тяхното използване като лекарствени носители, първо ще се спрем на основните възгледи в тази насока.

В началото на ХХ в. големият имунолог и баща на съвременната медицинска химия Паул Ерлих формулира концепцията за идеалните лекарства, които трябва да действат като „вълшебни куршуми“ – автоматично да улучват и селективно да унищожават болните клетки, без да увреждат околната здрава тъкан. Оттогава насам тази идея естествено се превърна в пътеводна звезда за разработването и приложението на терапевтични средства. Една нейна модерна версия схематично е показана на фиг. 4. Лекарството е асоциирано с носител, който го транспортира (най-вече чрез кръвния ток) до болната тъкан. Носителят е снабден с рецепторна структура, която го свързва с клетките мишени. Освен това е необходим и механизъм за освобождаване на препарата. Въпреки развитата досега активна дейност, за съжаление трябва да се каже, че все още сме далеч от цялостната реализация на идеята на Ерлих.

Тук сме се помъчили да покажем някои възможни ефективни реализации по пътя към тази заветна цел. Независимо че параграфът е посветен главно на везикуларните системи, той дава представа изобщо за подходите (най-вече физикохимични, а също фармакологични и биохимични) в решаването на проблема за използването на ЛМС за терапевтични цели.

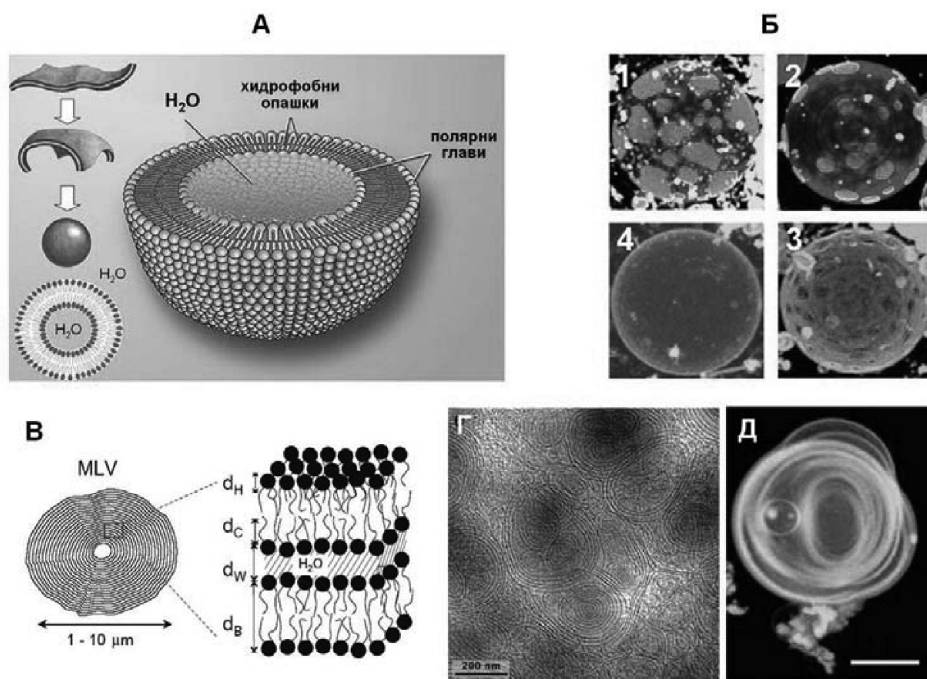


Paul Ehrlich
(1854-1915)



Фиг. 4. Горе: Паул Ерлих [13]. Долу: Принципна схема на съставните части на „вълшебните куршуми“ [10]

Отдавна познатите липидни везикули, или т.нар. *липозоми* (от гр. λίπος мазнина + σφύρα тяло, материална същност), са може би най-често срещаната моделна система. Терминът липозом се използва за означаване изобщо на всякакво затворено липидно образувание, ограждащо обем с воден разтвор [8] (фиг. 5). От тях са известни най-различни варианти, като например мултиламеларните (многослойни) везикули (англ. MultiLamellar Vesicles, MLV), представляващи концентрично подредени бислоини филми (стотици), разделени помежду си от водна фаза (фиг. 5В, Г), които спонтанно се получават от болшинството фосфолипиди при диспергирането им във водна среда. Друг широк клас са едностенните малки (Small Unilamellar Vesicles, SUV; диаметър 20–50 nm) и големи (Large Unilamellar Vesicles, LUV; диаметър 50–500 nm) везикули, които биват формирани с разнообразни методи [42, 40].

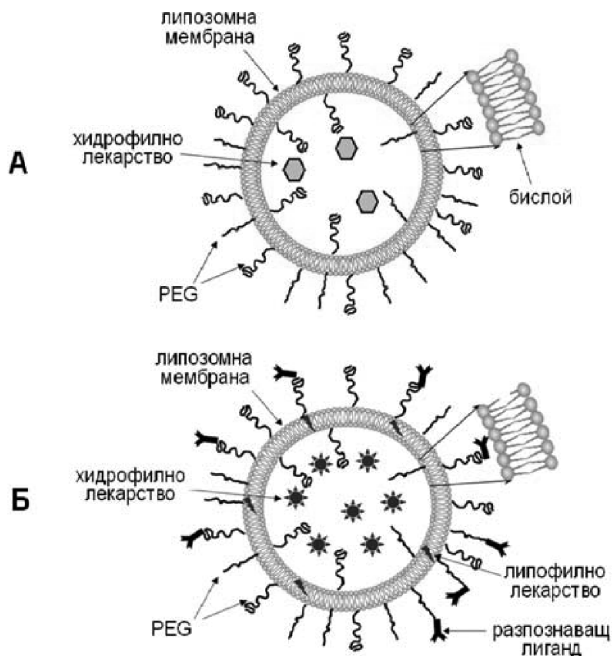


Фиг. 5. (А) Схематично представяне на липозом – затвореният липиден бислой граничи отвътре и отвън с воден разтвор. (Б) 3D изображение от конфокална флуоресцентна микроскопия на *GUV*, маркиран с две флуоресцентни сонди, показващи фазовото разделяне [81]. (В) Схема на *MLV*: d_W – ширина на водната фаза, d_B – дебелина на бислоя, включваща d_H – зона на полярните глави, и d_C – зона на опашките [67]. (Г) Трансмисионна електронно-микроскопска снимка (сгуо-ТЕМ) на *MLV* от моноолеин/натриев олеат/ $D_2O = 10/5/85$ [30]. (Д) Конфокално микроскопско изображение на различните слоеве от *MLV*, съдържащ *POPC* и флуоресцентния маркер *DiIc₁₈* [25]

В тази глава малко по-подробно ще се спрем на т.нар. *гигантски едно-листови везикули* (англ. Giant Unilamellar Vesicles, GUV). Те представляват достатъчно големи ($>20 \mu\text{m}$ в диаметър) затворени бислойни сфери, за да бъдат наблюдавани оптично. Всъщност подобни хидратирани липозомни структури от лецитинов екстракт са били регистрирани със светлинна микроскопия от Вирхов още в средата на XIX в.

Причините за голямата популярност на гигантските везикули са няколко. Първо, те са сравнително лесни за получаване и съставът им и условията на външната среда могат да бъдат прецизно контролирани. Това дава голямото предимство да се изследва фазовото поведение както на дву- и три-компонентни смеси от чисти липиди, така и на естествени липидни фракции или нативни мембрани [62], а също да се манипулират GUV с вградени мембранни белтъци [46]. Второ, GUV позволяват директно наблюдение на единични екземпляри с оптична микроскопия [24] и, трето, размерите и сферичната им форма са твърде близки до тези на плазмалемата. Със самото им дефиниране през 60-те години на XX в. като малки липидни капсули, съдържащи вода (фиг. 5А), липозомите дадоха големи надежди за потенциални кандидати да играят ролята на „вълшебни куршуми“ [26, 27]. Съображенията за това са следните: липозомите са лесни за възпроизвеждане структури и са изградени от нетоксични биосъвместими материали; водният им лумен може да съдържа хидрофилни вещества, докато бислоят им да бъде натоварен с хидрофобни или амфифилни съединения; притежават различни размери (някои са достатъчно малки, за да преминат и през най-фините капилляри); на повърхността им могат да бъдат разположени специфични химични групи, играещи ролята на разпознавателни елементи, с помощта на които да се ориентират към клетките мишени (фиг. 6).

Независимо обаче от положените колослни усилия за разработването на липозомно базирани системи за доставяне в организма на лекарствени средства, едва в последно време бяха постигнати съществени успехи в тази насока. Един от главните проблеми е, че конвенционалните липозоми (фиг. 5А), вкарани в кръвообращението, много бързо биват „засечени“ от имунната система и елиминирани посредством нейните макрофаги. След тяхната деградация лекарствените препарати, които съдържат, се освобождават в кръвта, където или се разграждат, или, което е още по-лошо, започват да влияят пагубно на околните клетки (напр. еритроцитите). Друга, не малка пречка е затруднената екстравазация на липозомите поради ендотелната бариера между кръвоносните съдове и външната тъкан мишена. Тя е съставена от плътно подредени клетки, често подкрепени от базална мембрана [1], но за щастие в много примери целостта ѝ е нарушена именно в патологичните места. Така или иначе, стандартните липозоми в най-добрия случай едвам успяват да достигнат само до черния дроб и далака [10].



Фиг. 6. Дълготрайни липозоми с модифицирана повърхност, способни да се промъкват през барьерите на имунната система, служещи като носители на лекарствени средства. (А) Пасивно насочващи се липозоми, натоварени с хидрофилно лекарство във водната фаза (лумена). (Б) Активни липозоми с различни хидрофобни и амфифилни вещества, допълнително инкорпорирани в липидния бислой. Към повърхностното полимерно покритие ковалентно са прикачени елементи, разпознаващи клетките мишени [61]

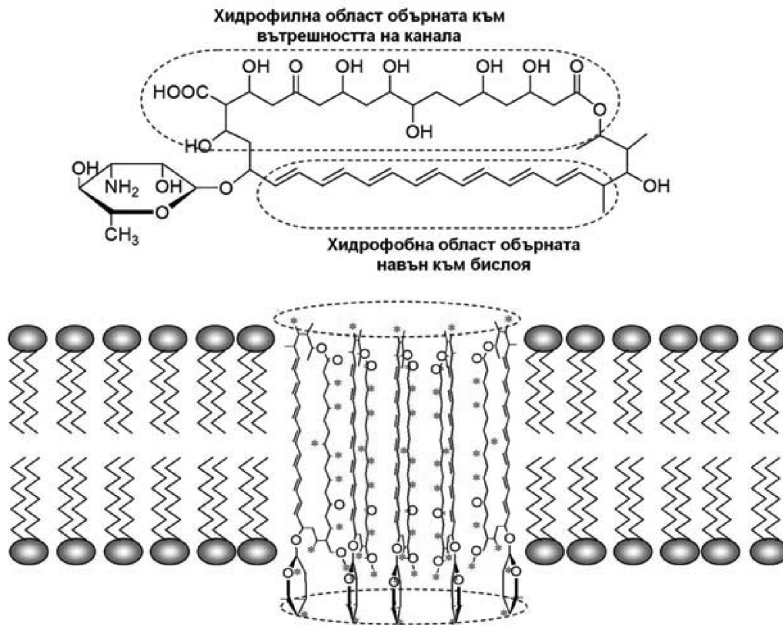
Много голям прогрес бе осъществен с изобретяването на т.нар. „прокрадвачи“* се липозоми, които са снабдени със специално покритие, „екраниращо“ ги от наблюдението на имунната система, подобно на модерните самолети, избягващи радарната локация [9]. Това най-често се постига с ковалентно прикачване на различни полимери (напр. полиетиленгликол, PEG [82], поливинилалкохол, PVA [76] или полиаминокиселини, PAA [71]) към главите на външния липиден монослой (фиг. 6). Такова хидрофилно полимерно покритие прави липозомите „невидими“, неуловими за имунната система поради близките му физикохимични свойства до водата [61].

Като резултат се повишава времето за циркулация в кръвта и се увеличава вероятността липозоми с подходящ размер (обикновено от 100 nm) да се подвизават по-дълго в капилярната мрежа на големите тумори. Тъй

*Англ. stealth – прокрадване, промъкване, промушване; потайно, незабелязано, тихо-мълком, крадешком.

като лимфния дренаж на туморите е потиснат в сравнение с този на здравите тъкани, липозомите са склонни да се натрупват в туморите. Този феномен, известен като *ефект на повишено пропускане и задържане*, значително подобрява ефикасността на доставяното лекарство и драстично снижава страничното му въздействие.

Едни от първите липозомно приложени лекарства са цикличният антибиотик Амфотерицин Б и противотуморният препарат доксорубин. Амфотерицин Б (фиг. 7) е силен, водоразтворим антибиотик, използван за третиране на общи инфекции, представляващи сериозна заплаха за пациенти с имунодепресивни симптоми, като болни от СПИН и подложени на интензивна хемотерапия. Успешната липозомна формула за доставка на доксорубина е позната като Doxil и е одобрена за лечение например на рак на яйчниците и на гърдата. Понастоящем съществуват редица противоракови лекарства, включени в липозомен носител, които са одобрени за клинична употреба, и още много други са в процес на тестване.



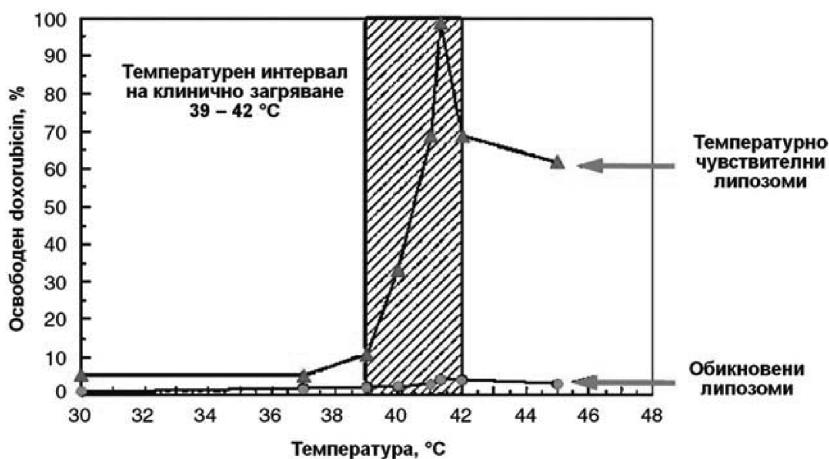
Фиг. 7. Структурна формула (горе) и начин на вграждане в бислоя (долу) на каналобразуващия йонофор Амфотерицин Б [35]. Със звездички (*) са отбелязани хидроксилните групи, повечето от които покриват вътрешността на канала. Показани са молекулите само от едната половина на канала

Свойствата на носещата система могат да се оптимизират в зависимост от конкретния случай чрез подбор на липидния състав и полимерните модификатори. Това е една сложна процедура, взимаща под внимание много подробности по отношение на лекарството, което се използва, болестта и молекулния състав на липозомното образувание. Що се отнася до активно насочване (фиг. 6Б) на липозомите към клетките-мишени, то може да се каже, че засега е постигнато много малко. С други думи, липозомните носители все още не могат да бъдат видяни като истински магически куршуми на Ерлих.

Колкото и да звучи парадоксално, подобрената стабилност на липозомите в даден момент се оказва техен недостатък. Един от сериозните проблеми на липозомната доставка на лекарства в организма е не толкова как да бъдат направени липидните микрокапсули по-издръжливи, отколкото как по-лесно да бъде изнесен навън носения препарат при достигане на целта. Нещо повече, той не само трябва да бъде освободен в значителни количества на предвиденото място, но и за точно определено време, съгласувано с неговия режим на действие. В много случаи локалното количество на лекарството при липозомно прилагане не надвишава това, получено от внасянето му в свободна форма. Причината е, че препаратът не може да напусне капсулата достатъчно бързо, за да осигури високи локални дози.

Физикохимично решение на проблема е предложено от Дейвид Нийдхам и сътрудници от университета Duke в щатите [66]. То се основава на използването на хипертермия, т.е. нагряване на тумора малко над телесната температура. Тази процедура дава няколко благоприятни ефекта. От една страна, разширяване на кръвоносните съдове в раковата тъкан, позволяващо промушването на липозомите в нея, а от друга, засилено поглъщане на лекарството от раковите клетки. Гвоздеят на програмата обаче е, че липозомите са проектирани да стават по-пропускливи с повишаване на температурата. Това се дължи на фазовия преход в бислоя, по време на който липидите заемат по-малко плътна опаковка, появяват се дефекти и хетерогенности, в резултат на което се увеличава проницаемостта за полярни и заредени вещества [10]. На този феномен именно се базира по-ефективното изтичане на лекарствения препарат от липозомите.

Конструирайки носители, чийто бислой е съставен от липиди с точка на фазовия преход, непосредствено над нормалната телесна температура, споменатите учени са успели да доставят 30 пъти повече лекарство, отколкото с обикновените липозоми. Както се вижда от фиг. 8, топлинно зависимите липозоми изпускат много бързо (в рамките на 20 секунди след загряването) съдържимия препарат в доста тесен температурен интервал, което е от критично значение за терапевтичния ефект. Клинично, локалното повишаване на температурата в областта на тумора се постига с микровълново или ултразвуково облъчване.

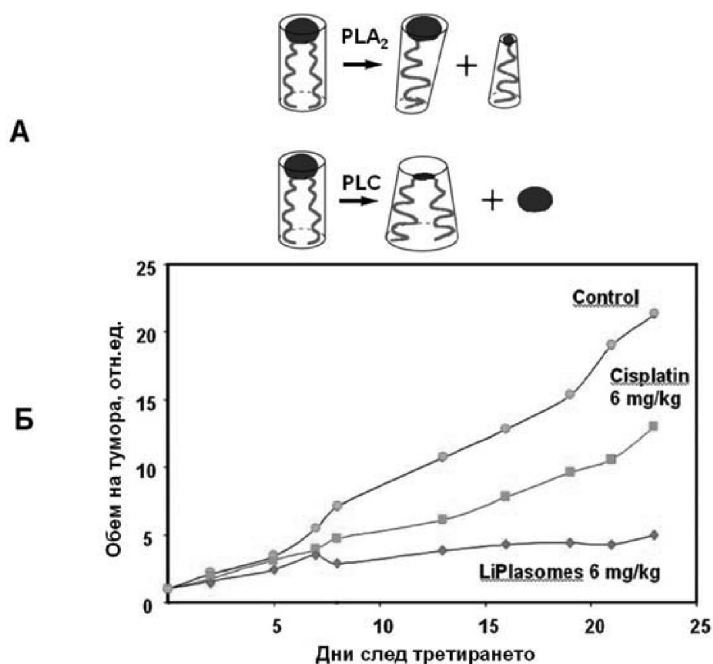


Фиг. 8. Освобождаване на доксорубицин от конвенционални и температурно зависими липозоми [66]

Недостатък на хипертермията като начин за индуциране на лекарственото освобождаване е необходимостта от предварителна диагностика, за да се локализира точно поразената тъкан, която трябва да се нагрее. По отношение на канцерогенезата в много случаи това не е възможно, особено в ранните стадии от развитието на тумора. За да се доближим до идеята на Паул Ерлих, очевидно са нужни процеси, които по-лесно да идентифицират болното място и да задействат разтоварването на лекарството в него.

Важна стъпка напред в тази насока е направена с въвеждането на нов механизъм за тригериране, който е резултат от един комбиниран физикохимичен и биохимичен подход. От фармакологична гледна точка той е нетрадиционен, тъй като използва по-скоро биофизични съображения, отколкото медицинска химия и лекарствено-рецепторни схеми. Предложената липозомна система се възползва, от една страна, от специфичните физикохимични свойства на липидния бислой, а от друга, от патофизиологичните и биохимичните свойства на раковите клетки. Пусковият механизъм за деградация на липозомите и освобождаване на препарата, който носят в мястото на малформацията, се основава на засилена ендогенна активност на секреторната фосфолипаза A_2 ($sPLA_2$). По принцип фосфолипазите са такъв клас ензими, които разцепват липидите в различни части на молекулата. Те променят физикохимичните свойства на мембраните, тъй като произвеждат продукти, склонни да формират неламерарни липидни фази. Например фосфолипаза A_2 генерира лизолипиди (едноверижни) и свободни мастни киселини, докато фосфолипаза C (PLC) дава диацилглицерол с разрушаване на връзки в полярната глава (фиг. 9А). Тези липиди са известни като „конични“ поради различния от единица параметър на опаковане (фиг. 2).

По-специално, секреторната фосфолипаза A_2 проявава активност само в мембранните интерфейси, но не и върху липидни мономери в разтвор. Нещо повече, нейното ензимно действие е много силно зависимо от физичното състояние на бислоя, в частност, локална кривина и дефекти [63]. Понеже самата тя генерира мембранно активни продукти, излиза, че е налице някаква форма на положителна обратна връзка и автокатализа. Този факт е много изгоден за реализацията на ензимния запусък механизъм. Освен това поради ентропийни причини, свързани с взаимното разположение на PEG и липидните молекули, sPLA₂ е по-ефективна върху модифицираните повърхности, отколкото върху голи недериватизирани липиди.



Фиг. 9. Ензимен механизъм, задействащ деструкцията на липозомите и неговото приложение в антитуморната терапия. (А) Образуване на конично оформени молекули под действие на фосфолипазите A_2 и С. (Б) Сравнение на резултатите от обработване на карциноми при мишки с препарата цисплатин: (●) контрола (без препарат), (■) 6 mg/kg цисплатин в свободна форма, (◆) 6 mg/kg цисплатин, инкапсулиран в липлазому; по данни на LiPlasome Pharma A/S [64]

По някакво щастливо стечение на обстоятелствата се оказва, че голяма част от различните видове тумори се характеризира със засилена експресия на sPLA₂ така, че нейната локална концентрация в увредената тъкан е на един-два порядъка по-висока от нивото ѝ в серума и много по-висока, отколкото в здравата тъкан около тумора [15]. Това явление позволява да бъ-

де разиграна комбинацията от пасивно насочване на липозомите и ензимен тригериращ механизъм [33].

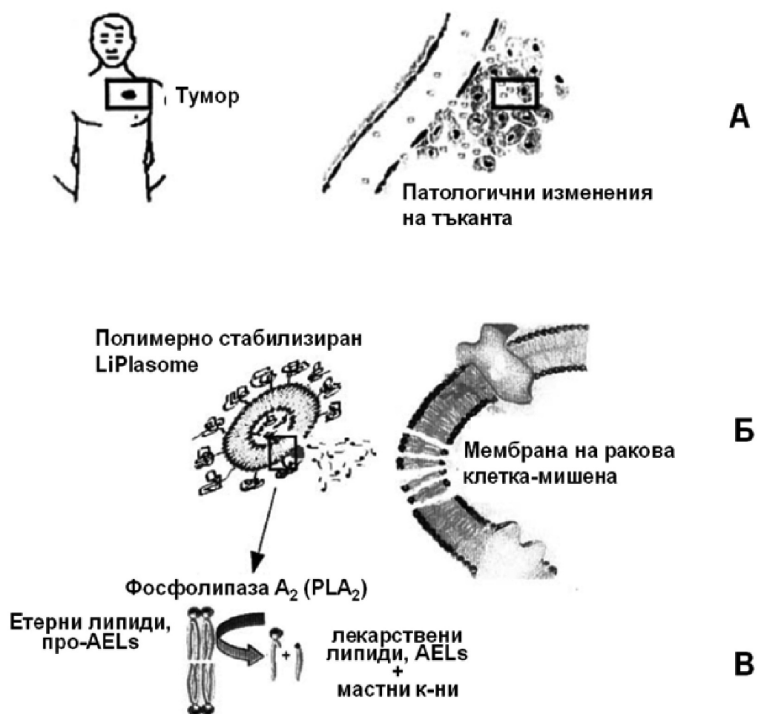
На полимерно стабилизираните липозоми, специално модифицирани за по-голяма чувствителност към хидролизата от страна на sPLA₂, бе дадено наименованието *липлазоми* (LiPlasomes) и те бяха препоръчани като дистрибуторна система за тумори с висока локална концентрация на фосфолипазата [17]. Дизайнът на липлазомите бе разработван с упорити проучвания върху моделни мембранни системи, за да се установят връзките между активността на sPLA₂ и физичните свойства на бислоя [63]. След многобройни *in vitro* експерименти с култури от ракови клетки бе проведено и тестване с препаратата цисплатин *in vivo* върху мишки. Резултатите недвусмислено показват, че така предложената система за прилагане на антитуморни агенти в организма е много по-ефикасна от традиционните липозоми (фиг. 9Б).

По-доброто представяне на липлазомната формулировка в сравнение със свободно внесения цисплатин (при същите токсични дози) се дължи и на още едно явление. Както казахме, продуктите от хидролизата на липидния носител са мембранно активни и предизвикват латерален стрес в бислоя, с което увеличават проникваемостта на раковите клетки. Така самите липиди на дистрибуторната система могат да играят ролята на антитуморни лекарства след активиране от sPLA₂ в болното място (фиг. 10).

Първите кандидати за липидни антитуморни про-лекарства, от които да бъде изградена носещата капсула, са моно-естер-моно-естер-глицеро-фосфолипидите, в които *sn-1* ацилната верига е свързана към глицеролния гръбнак с етерна връзка, а *sn-2* веригата е свързана с „нормална“ етерна връзка (фиг. 1А). Определени видове лизо-естерни липиди са известни със своята цитотоксичност и тъй като еритроцитите не притежават ензими за тяхното разграждане, инжектирането им в кръвта води до масивна хемолiza. Също толкова чувствителни към тях са и раковите клетки. Под формата на двувърижни естерно-естерни липиди обаче, влизащи в състава на капсулата, тези съединения не са опасни [16].

След казаното дотук не е трудно да се досетим каква е следващата стъпка в развитието на липлазомите. Ако към лизо-естерен липид се прикачи обичайно антитуморно средство, след хидролизата от sPLA₂ продуктите на разпада ще имат двойно действие срещу раковите клетки – лизо-естерните липиди ще атакуват мембраните, а освободеният лекарствен препарат ще прояви нормалната си активност.

Освен липозомите с „традиционни“ размери, като лекарствени носители се срещат и нано-варианти. Един оригинален метод за нанолипозомна формулировка е разработен преди десетина години от Мозафари и сътр. [11]. Докато повечето протоколи използват силен механичен стрес (озвучаване, хомогенизация, високи налягания), вредни химикали (органични разтвори-



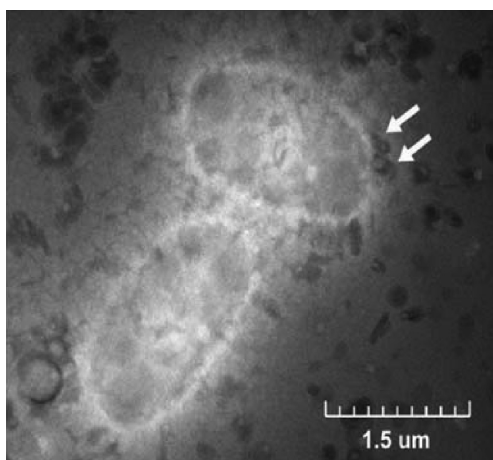
Фиг. 10. Схема на прилагане на антитуморни етерни липиди (англ. Anti-tumor Ether Lipids, AELs) чрез модифицирани липозоми. (А) Патологични изменения в тъканта, характеризиращи се с пропускливи капилляри и висока sPLA₂ активност. (Б) Пасивно насочване и взаимодействие на липозомите с клетките мишени. (В) Хидролизиране на липидите от носещата капсула с отделянето на мембранно активните етерни лекарствени липиди AELs [10]

тели, детергенти) или екстремни рН, новият метод предлага по-мека процедура, максимално запазваща активността на вграждания препарат. Той се базира главно на ефективно турбулентно разбъркване на липидните съставки при температура, над критичната, и многократно прекарване през филтърна мембрана със субмикронни пори. Получените нано-липозоми са с размери от порядъка на 200–300 nm и коефициент на полидисперсност (polydispersity index, PDI) около 0,2–0,3. Стабилността им достига от няколко до десетина месеца в зависимост техническите детайли и начина на съхранение. Тези липозоми се оказват много удобни носители на бактерициди при третирането на редица инфекциозни заболявания [5].

В цитираната работа е използван цикличният лантибиотик низин, секретирани от някои млечно-кисели бактерии (*Lactococcus lactis*), срещу различни Gram-положителни бактерии. Това е един катионен амфифилен пептид (34 аминокиселини, фиг. 11А), който съдържа няколко необичайни

афинитета на липозомите към някои бактерии, асоциирани с епидермиса на устната кухина и кожата. Катионните липозоми, включващи стеариламин, се държат по подобен начин. Повърхностно прикачените лектини**, очевидно също подпомагат свързването с бактериите мишени [43].

Като илюстрация на ефикасността на предложената формулировка на фиг. 12 е показано как nano-липозомите (в тъмно) са обградили бактерията и се прикрепват към повърхността ѝ.



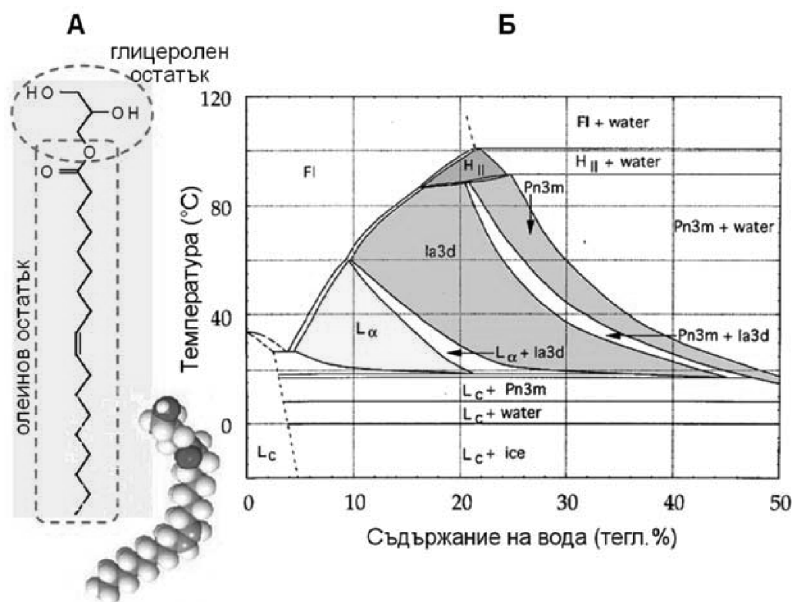
Фиг. 12. ТЕМ изображение на взаимодействието на nano-липозомите (посочени със стрелки) с грам-положителната бактерия *Bacillus subtilis* [5]

Липозомната формулировка от години е доказала преимуществата си пред директното прилагане на медикаментите. Тя с успех е използвана в третирането на редица заболявания в моделни, предклинични и клинични тестове. Въпреки това обаче понастоящем за рутинна употреба са в наличност много малко лекарствени средства от този тип, предимно цитираните по-горе антитуморни агенти [41].

В последните две десетилетия не малко усилия бяха положени за реализиране на носещи системи, базирани на неламеларни липидни фази, и използването им в депозирането на лекарствени препарати. В основни линии става дума за дисперсни кубични формирания, или т.нар. *кубозоми* (Cubosome®), фиг. 14) [79], които добиха широка известност, след като в своята докторска дисертация Томас Ландх [50, 51] показва много примери за възникване на би-

** Лектините от всички организми са протеини които свързват въглехидратите с голям афинитет и специфичност [6, 49]. Те участват в широк кръг процеси на клетъчно разпознаване, сигнализация и адхезия, а така също и във вътреклетъчното насочване на новосинтезираните полипептиди [12].

континуални кубични фази (фиг. 2) в бислоя на някои субклетъчни органиели *in vivo*. Освен това бързо се изясни, че тези нетрадиционни бислойни форми могат да намерят широко (био)нанотехнологично приложение, включително във фармакологията. Макар все още да не са повсеместно одобрени за клинична употреба, в редица тестове те са показали добри резултати като система за лекарствена доставка. За тяхно главно достойнство се сочи високото съотношение площ/обем на бислойната структура, както и улесненото отдаване на препаратите, с които са натоварени [77, 83, 84]. Тъй като едно от най-често използваните амфибилни съединения за получаване на различни кубични фази е моноолеина, по-долу на фиг. 13 е дадена неговата фазова диаграма.

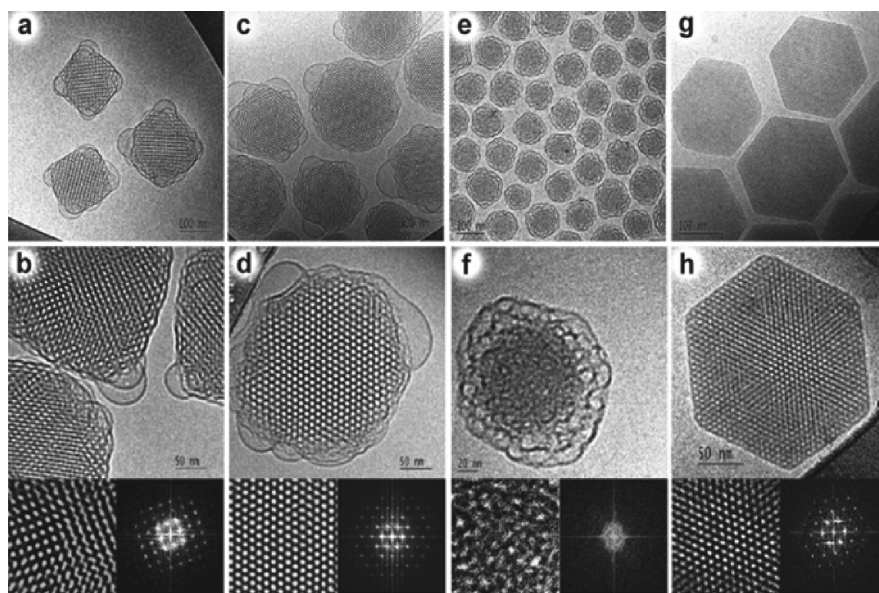


Фиг. 13. (А) Структурна формула и Ван-дер-Ваалсов модел на моноолеин (глицерол-моноолеат, GMO, 1-9*cis*-octadecenoyl-glycerol). (Б) Фазова диаграма за бинарна система моноолеин/вода, получена с помощта на рентгенова дифракция и диференциална сканираща калориметрия, DSC [31, 69]. Отбелязани са следните фази: L_c – твърда кристална, L_α – течна-кристална, FI – изотропна течна, ia3d – биконтинуална кубична Q_{II}^G , Pn3m – биконтинуална кубична Q_{II}^D , и H_{II} – обърната хексагонална

Въпреки че параметърът на опаковане на GMO се оценява на 1,07 (което означава толериране на неламеларни структури), фазовата диаграма на чистия моноолеин може да служи като пример за това, че в реалните лиотропни системи не винаги се срещат всички фази. В нея отсъства например биконтинуалната кубична фаза Q_{II}^P (базираща се върху P -повърхността,

пространствена група $Im\bar{3}m$). Независимо от това обаче, както се вижда, GMO показва доволно богато фазово поведение, което го прави привлекателен за целите на кубозомната формулировка.

Фрагментацията на обемните липидни кубични фази в дисперсна система от течно-кристални наночастици с многопреградно вътрешно устройство в много случаи се постига с използването на кополимери, показващи детергентни свойства (фиг. 14) [39, 28].



Фиг. 14. Типични cryo-TEM микрографии на различни неламеларни липидни наночастици: (a–d) частици, съдържащи биконтинуална кубична фаза от тип P($Im\bar{3}m$). Дисперсията е приготвена от смес на глицерол-моноолеат (GMO), кополимер Pluronic F127 и вода в тегловно съотношение GMO/F127/вода = 1.88/0.12/98.0; (e, f) монодисперсни частици, включващи гъбовидната (сюнгеров тип „sponge-like“) L_3 фаза, приготвени от смес на диглицерол-моноолеат (DGMO), глицерол-диолеат (GDO), кополимер P80 и вода в тегловно съотношение DGMO/GDO/P80/вода = 2.13/2.13/0.74/95.0; (g, h) монокристални частици на обратната хексагонална фаза H_{II} , получени от смес на DGMO/GDO/F127/вода = 2.25/2.25/0.5/95.0. Най-долният ред показва увеличени области от частиците с техните фурие-трансформации, даващи характерната периодичност за съответните мезофази, отбелязани по-горе [28]

Механизмът на този процес не е напълно изяснен. Процедурата обикновено включва високо енергетични техники на възбуждане, като силна латерална хомогенизация, свръхзвучаване, топлинна обработка в автоклав. При стайни температури дисперсната система се състои преимуществено от съвместно съществуващи кубични и везикуларни частици. Третирането с висока температура при 125°C предизвиква трансформация на бислойните везикули в ку-

бични наноструктури. Това се дължи на сливането на липозомите в кубозомни обекти с по-големи размери и по-плътна вътрешна бислойна опаковка.

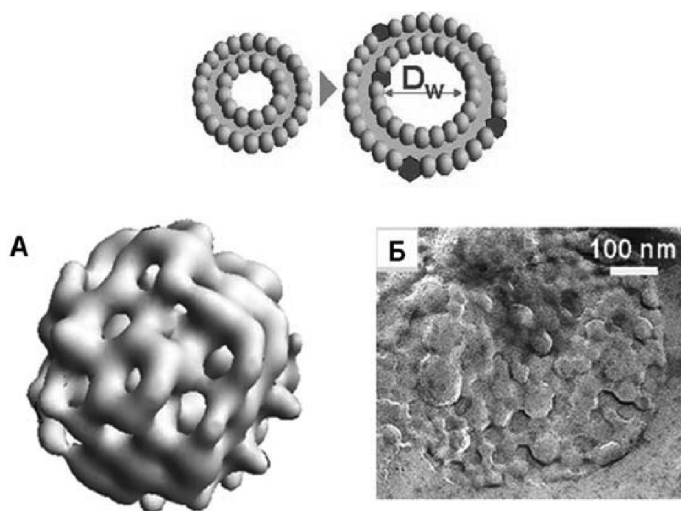
Очевидно от особен интерес е възможното използване на кубозомите за задържане в тях на биомакромолекули (като пептиди, белтъци, ДНК), запазващи естествената си структура и функции [55]. Протеиново натоварени кубозомни частици (*протеокубозоми*) вече са били проучвани и резултатите показват, че те представляват високо подредени наноструктури, които изглеждат перспективни като носеща система, способна да доставя белтъчни компоненти [20–22]. По този въпрос се работи много интензивно и е налице изобилна литература, чийто преглед може да бъде предмет на широк обзор. Ето защо тук ще спрем вниманието само върху успехите на един френско-български екип, постигнати в тази насока в последните години.

За вграждането на биосъвместими макромолекули в кубозомите, могат да се посочат поне две сериозни пречки – „силовата“ обработка за получаването им и малкият размер на каналите в кубичната фаза. Съвсем ясно е, че дадените стандартни процедури за формиране са несъвместими със запазването на нативната конформация и функционалната активност на биомакромолекулите. Един алтернативен подход предвижда приготвянето на кубозомите да става в съответствие с лиотропните фазови преходи на трикомпонентната система моноглицерид/етанол/вода. Той разчита на преципитация на наночастиците под въздействие на разреждането без намесата на силно външно възбуждане [78]. Този метод осигурява функционализиране на кубозомите, при условие че конформацията на пептидите не се влияе от органичния разтворител.

В тази връзка предлаганата от споменатия научен екип стратегия, описана в една обзорна работа [23], изглежда доста по-съвършена. Най-общо може да се каже, че тя се базира на възможността за контролирана хидратация на неламеларните фази на някои нейонни липиди, като ГМО, монолинолеина, фитантриола и др. Понастоящем изследването на тяхното фазово поведение с увеличаване на водното съдържание е важна предпоставка за напредъка в развитието на липидни наноносители с многосекторно вътрешно устройство.

При ниска степен на хидратация, от порядъка на 40 тегл.%, вграждането на протеини в бислоя на наночастиците води до конкуренция за водната фаза между макромолекулите и самоасоцииращите се липиди. В това състояние се наблюдават биконтинуалните фази $G(Ia3d)$ и $P(Im3m)$, които нормално не се срещат при напълно хидратирани смеси ГМО/вода без протеини (фиг. 13). Диаметърът на водните канали в решетката на ромбоидната фаза $D(Pn3m)$ е около 2,5–3,5 nm [20, 21]. Независимо че тази големина на наноканалите не надхвърля размерите на по-едрите белтъци, установено е, че те успешно се включват в кубичните фази. Явно тяхното разположение не е изцяло във водните канали, което се потвърждава от данните по рентгенова дифракция.

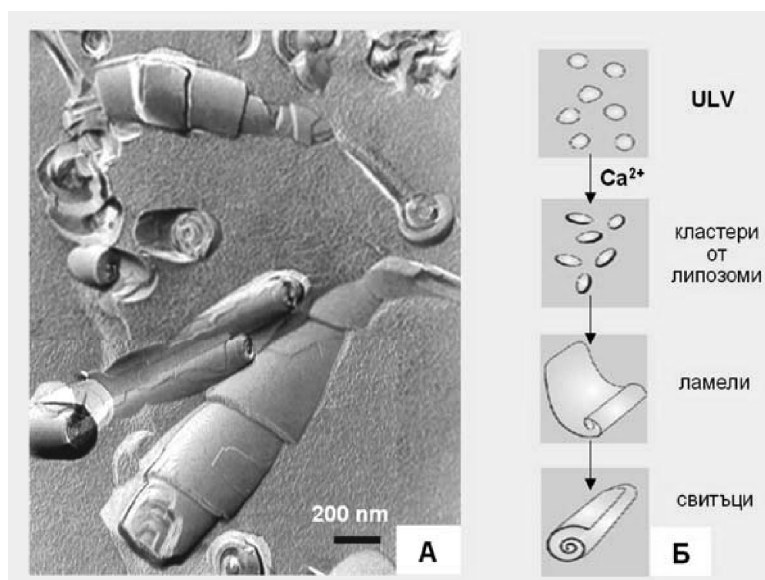
Добре известно е, че биконтинуалната водно-липидна мрежа е чувствителна към външно въздействие. Така манипулирането на размера на каналите чрез външни стимули представлява удачно решение на проблема за ефикасното вграждане на макромолекули в липидните носители. В този смисъл поемането на вода и набъбването на биконтинуалните GMO фази трябва да се разглежда като свързано с модулирането на кривината на бислоя. Такива изменения в ширината на тримерния (3D) лабиринт от водни фази и дебелината на бислоя могат да се постигнат с различни добавки към основния моноглицерид. Засега са докладвани примери на промяна в диаметъра на каналите с помощта на заредени липиди и липо-пептиди, а също и с прибавянето на някои повърхностно активни вещества, ПАВ (англ. surfactants). Заради параметъра на опаковане, тяхното действие се основава именно на намаляването на кривината на бислоя и оттам засилване на хидратацията. Например нейонните сурфактанти октилглюкозид и додецилмалтозид драстично изменят течно-кристалната структура на GMO при акомодирането си в интерфейса полярна/неполярна област. В резултат на това структурите набъбват, стават по-плоски (близки до преход към ламеларни, или L_3 -сюрджеров тип фази) и диаметърът на водните канали се увеличава до ~ 7 nm [18] (фиг. 15, горе).



Фиг. 15. Горе: изменение размера на каналите с намаляване на кривината на бислоя заради включването в него на молекули с параметър на опаковане < 1 [18]. Долу: протеокубозоми със силно хидратирана неламеларна фаза: (А) Модел на биконтинуалната повърхност на кубозомна наночастица, съдържаща нанокаверни, породени от разширението на каналите във водната фаза. Слабо подредената липидна D- фаза се преплита с водните канали. (Б) Трансмисионна електронно-микроскопска снимка, получена след замразяване и нарязване с микротом на образците (т.нар. freeze-fracture, FF-ТЕМ методика), даваща представа за вътрешната организация на GMO протеокубозом. Вижда се липсата на идеална монокристална подредба.

Предполага се, че протеиновите молекули са разположени в нанокаверните [19, 23]

Освен сферичните липозоми, в момента предмет на усилено внимание са и различни нетрадиционни липидни образувания. Едни много характерни по форма структури, удачно наречени „охлювчета“ (англ. cochleates), бяха описани още в средата на 70-те години на XX в. от Папахаджиопулос и сътр. [68]. Те представляват пурообразни, плътно навити липидни слоеве, които се получават със сравнително лесен протокол. Той включва няколко стъпки на трансформиране на еднослойни везикули (ULV), изградени от отрицателно заредения фосфатидилсерин (PS). Първоначално поради наличието на Ca^{2+} катионни мостове, свързващи отрицателно заредените полярни глави на PS, ULV кондензират в по-големи кластери, които се сливат и дават широки липидни листове. Вместо обаче да образуват затворени сферични структури, тези ламелни образувания се завиват под формата на цилиндрични свитъци (фиг. 16).



Фиг. 16. Охлювчетата на Папахаджиопулос. (А) FF-ТЕМ снимка, показваща типичните липидни свитъци. (Б) Последователни етапи от процедурата за получаване на „охлювчетата“ [87]

Много скоро след откриването им „охлювчетата“ привлякоха интереса на фармаколозите [37]. Това не бива да ни учудва, като се има предвид, че проблемите, касаещи режима на внасяне на медикаментите в организма далеч не са по-малки, отколкото тези, свързани със самото им разработване. Тъй като притежават както хидрофобни, така и хидрофилни повърхности, тези интересни липидни формирания се оказват подходящи за капсулиране и на

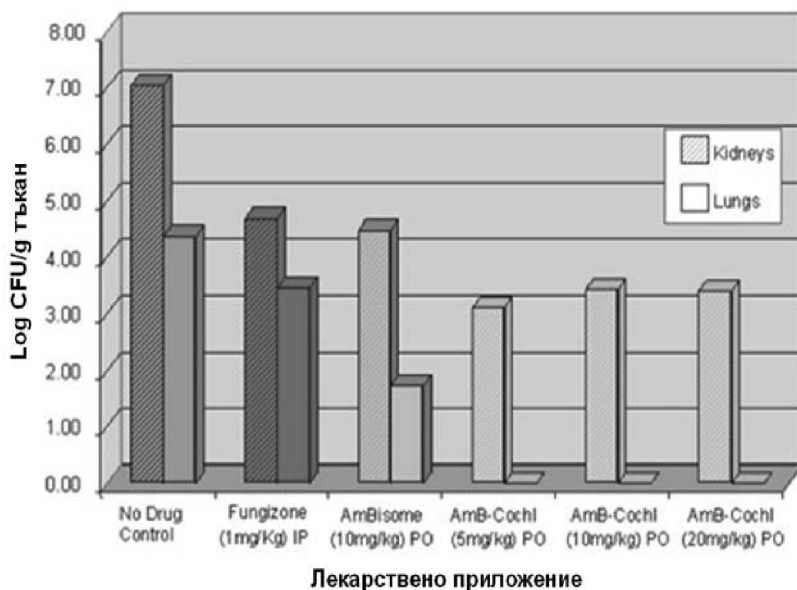
хидрофобни препарати (като Амфотерицин Б, АмВ; фиг. 7) и на амфипатични лекарства, като доксорубин. Ефективността на инкорпориране на препаратите зависи по-скоро от физикохимичните им свойства, докато размерите на получените комплекси зависят от процедурата на вграждане [86]. Пуруобразните свитъци съдържат най-вече фосфатидилсерин (PS), който се среща предимно в мембраните на невроните и понастоящем широко се препоръчва като хранителна добавка, подпомагаща менталните функции и задържаща процесите на стареене на мозъчната тъкан.

Докладваните в литературата „охлювчета“, използвани през 80-те и 90-те години на ХХ в. за транспорт на антигени и пептиди при ваксините, не винаги имаха еднаква унифицирана структура. В зависимост от процедурата за получаване те се явяваха или във формата на слепени листове и свитъци, или като големи игловидни образувания. С усъвършенстване на протокола за формиране стана възможно рутинното възпроизвеждане на стабилни наночастици с размери < 500 nm (фиг. 16). Тези частици с успех са използвани за модифициране с хидрофобни макромолекули [87].

Фармакокинетичните изследвания на „заредени“ с АмВ наночастици (САМВ) показват, че след орално (per os, PO) подаване на ?с-комплексите, разпределението на АмВ в тъканите мишени следва редът – най-високи концентрации в бъбреците и съответно намаляващи в белите дробове, черния дроб, жлъчката и мозъка. Като цяло тестовете очертават добри изгледи за прилагането на „охлювчетата“ като надеждна система за доставяне на лечебни средства. От друга страна, също е изяснено, че действието на имунните фактори чувствително затруднява задачата на САМВ поради унищожаването им от макрофагите в кръвообращението.

Много добро представяне на САМВ е отбелязано срещу гъбични инфекции от типа на кандидиазис, аспергилозис, криптококозис и др. Данните, изложени на фиг. 17, недвусмислено говорят за ефикасността на тази лекарствена формулировка.

Като пример за способността на САМВ да се справят с общи гъбични инфекции на фиг. 17 е даден ефектът от третирането на мишки, заразени с кандидиазис (предизвикан от *Candida albicans*). При интраперитонеално (IP) вкарване на комплексите мишките се оказват защитени от инфекцията още след поемането на минимални дози, от порядъка на 0,1 mg/kg/ден. Оралното вкарване (PO) на САМВ предизвиква дозово зависимо намаление на общия брой микроорганизми в колонията (CFU) за бъбреците и белите дробове. Тотално премахване на *C.albicans* от дробовете се наблюдава след PO при САМВ дози от 2,5 mg/kg/ден, което е съизмеримо с IP приложението на Фунгизона.



Фиг. 17. Тъканно натоварване на бъбреците и белите дробове при мишки, заразени с кандидиазис, след третиране с САМВ, AmBisome и Фунгизон [87]

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработването на системи за пренасяне и депозиране на лекарствени препарати в организма е бързо развиващо се модерно направление, продиктувано от необходимостта за тяхното адекватно действие. Добре известен е проблемът с разграждането на медикаментите (в много случаи на токсични крайни продукти), водещ до нежелателни странични ефекти и/или загуба на ефективност. От друга страна, още от раждането на концепцията на Паул Ерлих за „вълшебните куршуми“, не е затихнал стремежът да се намерят средства за насочването им към точно зададени клетки мишени, без да се засяга здравата тъкан. Това именно определя големия интерес за получаването на подходящи носещи структури, които, запазвайки функционалната активност на препарата, да бъдат в състояние да го доставят в местата на патологични изменения.

Независимо от положените усилия и не малките постигнати успехи с различни не-липозомни системи [34, 70, 47], като най-перспективно направление в тази област се очертава формулирането на носители, базиращи се на състава и свойствата на биомембраните. Това не изглежда странно от гледна точка на огромното разнообразие от структури и функции, които клетъчни-

те мембрани изпълняват. Много важна черта на липидите, като изграждащи елементи за инкапсулиране на макромолекулни препарати, е тяхната биосъвместимост, осигуряваща естествено обкръжение, което поддържа нативната конформация. Също така като природни нетоксични вещества тяхното приложение в организма значително се улеснява. Нещо повече, в последните години недвусмислено се оформи разбирането за сложната латерална компартиментализация на мембраните *in vivo* и за активната роля на липидния бислой в регулирането на дейността на мембранните белтъци [64]. Разкриването на редица нови уникални физикохимични свойства на липидните системи (в частност бислойнните) доведе до изясняването на много детайли от фазовото им поведение, което спомогна за получаването в лабораторни условия на нови структурни форми с контролирани параметри и манипулируема, отнапред зададена архитектура. Всичко това дава основание да се надяваме, че с всеки изминат ден се приближаваме до гениалната идея на Паул Ерлих и че в близко бъдеще ни очакват много по-ефикасни решения за пренасяне, насочване и модулиране на лекарствените средства в организма.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Петков, П., Ив. Георгиев, В. Доков. Обща хистология и ембриология. Медицина и физкултура. София, 1986.
- [2] Шелудко, А. Колоидна химия. Наука и изкуство. София, 1966.
- [3] Alberts, B., A. Johnson, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York, 2002.
- [4] Bagatolli, L. A. *Membranes and Fluorescence Microscopy*. New York, 2009, p. 33–51.
- [5] Cevc, G. and D. Marsh. *Phospholipid Bilayers. Physical Principles and Models*. New York, 1987, p. 442.
- [6] Finkelstein, A. Aqueous pores created in thin lipid membranes by the antibiotics nystatin, amphotericin B and gramicidin A. Implications for pores in plasma membranes. London, 1974, pp. 241–250.
- [7] Fukuda, M. and O. Hindsgaul. *Molecular Glycobiology*. IRL Press at Oxford University Press. New York, 1994.
- [8] Garrett, R. H. and C. M. Grisham. *Biochemistry*. 2nd ed. Orlando, 1998.
- [9] Gennis, R. B. *Biomembranes: molecular structure and function*. New York, 1989.
- [10] Landh, T. *Cubic cell membrane architectures. Taking another look at membrane bound cell spaces*. Lund University. Sweden, 1996.
- [11] Lasic, D. D. and D. Papahadjopoulos. *Medical Applications of Liposomes*. Elsevier. Amsterdam, Holland, 1998.
- [12] Lewis, R. N., D. A. Mannock and R. N. McElhaney. *Membrane lipid molecular structure and polymorphism*. San Diego, 1997, pp. 25–102.
- [13] Liskamp, R. M. J., D. T. S. Rijkers, and S. E. Bakker. *Bioactive macrocyclic peptides and peptide mimics*. Weinheim, 2008, pp. 1–27.
- [14] Luzzati, V. *X-ray diffraction studies of lipid-water systems*. New York, 1968, pp. 71–123.
- [15] Metselaar, J. M. *Liposomal targeting of glucocorticoids. A novel treatment approach for inflammatory disorders*. Utrecht University, 2003.

- [16] Mouritsen, O. G. *Life as a Matter of Fat. The emerging science of lipidomics*. Springer Verlag, Heidelberg, 2005.
- [17] Mozafari, M. R. and S. M. Mortazavi. *Nanoliposomes: From Fundamentals to Recent Developments*. Trafford Publishing Ltd. Oxford, UK, 2005.
- [18] Nelson, D. L. and M. M. Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th ed. New York, 2005.
- [19] Nobel Lectures. *Physiology or Medicine 1901-1921*. Elsevier Publishing Company. Amsterdam, 1967.
- [20] Romberg, B. Poly(amino acid)s: next-generation coatings for long-circulating liposomes. Doctoral Thesis., Utrecht University, 2007.
- [21] Seddon, J. M. and R. H. Templer. *Polymorphism of Lipid-Water Systems*. Elsevier Science B.V., 1995.
- [22] Tanford, C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*. 2nd ed. New York, 1980.
- [23] Yaghmur, A. and M. Rappolt. *Liquid Crystalline Nanoparticles as Drug Nanocarriers*. London, 2010, p. 339–353.
- [24] Abe, T., K. Sakamoto, H. Kamohara, Y. Hirano. Group II phospholipase A2 is increased in peritoneal and pleural effusions in patients with various types of cancer. – *Int. J. Cancer.*, 1997, **74**, 245–250.
- [25] Andresen, T. L., J. Davidsen, M. Begtrup, O. G. Mouritsen, and K. Jørgensen. Enzymatic release of anti-tumor ether lipids by specific phospholipase A2 activation of novel liposome-forming prodrugs. – *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 1694–1703.
- [26] Andresen, T. L., S. S. Jensen, and K. Jørgensen. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release. – *Prog. Lipid Res.*, 2005, **44**, 68–97.
- [27] Angelov, B., A. Angelova, M. Ollivon, C. Bourgaux, and A. Campitelli. Diamond type lipid cubic phase with large water channels. – *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 7188–7189.
- [28] Angelov, B., A. Angelova, B. Papahadjopoulos-Sternberg, S. Lesieur, J. F. Sadoc, M. Ollivon, and P. Couvreur. Detailed structure of diamond-type lipid cubic nanoparticles. – *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 5813–5817.
- [29] Angelova, A., B. Angelov, B. Papahadjopoulos-Sternberg, C. Bourgaux, and P. Couvreur. Protein driven patterning of self-assembled cubosomic nanostructures: Long oriented nanoridges. – *J. Phys. Chem. B.*, 2005a, **109**, 3089–3093.
- [30] Angelova, A., B. Angelov, B. Papahadjopoulos-Sternberg, M. Ollivon, C. Bourgaux. Proteo-cubosomes: Nanoporous vehicles with tertiary organized fluid interfaces. – *Langmuir.*, 2005b, **21**, 4138–4143.
- [31] Angelova, A., B. Angelov, S. Lesieur, R. Mutafchieva, M. Ollivon, C. Bourgaux, R. Willumeit, and P. Couvreur. Dynamic control of nanofluidic channels in protein drug delivery vehicles. – *J. Drug Delivery Sci. Technol.*, 2008, **18**, 41–45.
- [32] Angelova, A., B. Angelov, R. Mutafchieva, S. Lesieur, and P. Couvreur. Self-assembled multi-compartment liquid crystalline lipid carriers for protein, peptide, and nucleic acid drug delivery. – *Acc. Chem. Res.*, 2011, **44**(2), 147–156.
- [33] Bagatolli, L. A. To see or not to see: Lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. – *Biochim. Biophys. Acta.*, 2006, **1758**, 1541–1556.
- [34] Bangham, A. D. and R. W. Horne. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. – *J. Mol. Biol.*, 1964, **8**, 660–668.
- [35] Bangham, A. D. Surrogate cells or Trojan horses. The discovery of liposomes. – *Bioessays.*, 1995, **17**, 1081–1088.

- [36] Barauskas, J., M. Johnsson, and F. Tiberg. Self-Assembled Lipid Superstructures: Beyond Vesicles and Liposomes. – *Nano Lett.*, 2005, **5**(8), 1615–1619.
- [37] Benech, R. O., E. E. Kheadr, R. Laridi, C. Lacroix, and I. Fliss. Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mixed culture. – *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**, 8, 3683–3690.
- [38] Borné, J., T. Nylander and A. Khan. Phase Behavior and Aggregate Formation for the Aqueous Monoolein System Mixed with Sodium Oleate and Oleic Acid. – *Langmuir.*, 2001, **17**, 7742–7751.
- [39] Briggs, J., H. Chung and M. Caffrey. The temperature-composition phase diagram and meso-phase structure characterization of the monoolein/water system. – *J. Phys. II France.*, 1996, **6**, 723–751.
- [40] Cherezov, V., J. Clogston, Y. Misquitta, W. Abdel-Gawad and M. Caffrey. Membrane Protein Crystallization In Meso: Lipid Type-Tailoring of the Cubic Phase. – *Biophys. J.*, 2002, **83**, 3393–3407.
- [41] Colas, J. C., W. Shi, V. S. N. Malleswara Rao, A. Omri, M. R. Mozafari, and H. Singh. Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. – *Micron.*, 2007, **38**, 841–847.
- [42] Davidsen, J., K. Jørgensen, T. L. Andresen, and O. G. Mouritsen. Secreted phospholipase A(2) as a new enzymatic trigger mechanism for localized liposomal drug release and absorption in diseased tissue. – *Biochim. Biophys. Acta.*, 2003, **1609**, 95–101.
- [43] Esfand, R. and D. A. Tomalia. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. – *Drug Discov.*, 2001, **6**, 427–436.
- [44] Fogerite, S. Gould-, M. Kheiri, F. Zhang, Z. Wang, A. Scolpino, E. Feketeova, M. Canki, and R. J. Mannino. Targeting Immune response induction with cochleate and liposome-based vaccines. – *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1998, **3**, 273–287.
- [45] Frolov, V. A., A. V. Shnyrova, and J. Zimmerberg. Lipid polymorphisms and membrane shape. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2011, doi:10.1101/cshperspect.a004747.
- [46] Griffin, W. C. Classification of surface-active agents by hydrophilicity lipophilicity balance. – *J. Soc. Cosmetic Chemists.*, 1949, **1**, 311–326.
- [47] Gustafsson, J., H. Ljusberg-Wahren, M. Almgren, and K. Larsson. Cubic lipid-water phase dispersed into submicron particles. – *Langmuir*, 1996, **12**, 4611–4613.
- [48] Hope, M. J., M. B. Bally, L. D. Mayer, A. S. Janoff, and P. R. Cullis. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. – *Chem. Phys. Lipids.*, 1986, **40**, 89–107.
- [49] Hoven, J. M. van den, S. R. Van Tomme, J. M. Metselaar, B. Nuijen, J. H. Beijnen, and G. Storm. Liposomal drug formulations in the treatment of Rheumatoid Arthritis. – *Mol. Pharmaceutics.*, 2011, **8**, 1002–1015.
- [50] Huang, C. H. Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. – *Biochemistry.*, 1969, **8**, 344–351.
- [51] Israelachvili, J. N., D. J. Mitchell, B. W. Ninham. Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers. – *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II.*, 1976, **72**, 1525–1568.
- [52] Israelachvili, J. N., S. Marcelja and R. L. Horn. Physical principles of membrane organization. – *Quart. Rev. Biophys.*, 1980, **13**, 121–200.
- [53] Jones, M. N. Use of liposomes to deliver bactericides to bacterial biofilms. – *Meth. Enzymol. Part E.*, 2005, **391**, 211–228.
- [54] Kahya, N. Protein–protein and protein–lipid interactions in domain-assembly: Lessons from giant unilamellar vesicles. – *Biochim. Biophys. Acta.*, 2010, **1798**, 1392–1398.
- [55] Kamburova, K., V. Milkova, I. Petkanchin, and T. Radeva. Effect of pectin charge density on formation of multilayer films with chitosan. – *Biomacromolecules.* 2008, **9**(4), 1242–1247.

- [56] Kauzmann, W. Some factors in the interpretation of protein denaturation. – *Adv. Protein Chem.*, 1959, **14**, 1–63.
- [57] Kilpatrick, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. – *Biochim. Biophys. Acta.*, 2002, **1572**, 187–197.
- [58] Landh, T. From entangled membranes to eclectic morphologies: cubic membranes as subcellular space organizers. – *FEBS Lett.*, 1995, **369**(1), 13–17.
- [59] Larsson, K. Cubic lipid-water phases: structures and biomembrane aspects. – *J. Phys. Chem.*, 1989, **93**, 7304–7314.
- [60] Larsson, K. Aqueous dispersions of cubic lipid-water phases. – *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2000, **5**, 64–69.
- [61] Larsson, K. Lyotropic liquid crystals and their dispersions relevant in foods. – *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2008, **14**, 16–20.
- [62] Marsh, D. Lateral pressure in membranes. – *Biochim. Biophys. Acta.*, 1996, **1286**, 183–223.
- [63] Marsh, D. Protein modulation of lipids, and vice-versa, in membranes. – *Biochim. Biophys. Acta.*, 2008, **1778**, 1545–1575.
- [64] Montes, L. R., A. Alonso, F. M. Goñi, and L. A. Bagatolli. Giant unilamellar vesicles electroformed from native membranes and organic lipid mixtures under physiological conditions. – *Biophys. J.*, 2007, **93**, 3548–3554.
- [65] Mouritsen, O. G., T. L. Andresen, A. Halperin, P. L. Hansen, et al. Activation of interfacial enzymes at membrane surfaces. – *J. Phys.: Condens. Matter.*, 2006, **18**, S1293–S1304.
- [66] Mouritsen, O. G. Lipids, curvature, and nano-medicine. – *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2011, **113**, 1174–1187.
- [67] Mulders, J. W., I. J. Boerrigter, H. S. Rollema, R. J. Siezen, and W. M. DeVos. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. – *Eur. J. Biochem.*, 1991, **201**, 581–584.
- [68] Needham, D., G. Anyarambhatla, G. Kong, and M. W. Dewhirst. A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: characterization and testing in a human tumor xenograft model. – *Cancer Res.*, 2000, **60**, 1197–1201.
- [69] Pabst, G. Global properties of biomimetic membranes: perspectives on molecular features. – *Biophys. Rev. Lett.*, 2006, **1**(1), 57–84.
- [70] Papahadjopoulos, D., W. J. Vail, K. Jacobson, G. Poste. Cochleate lipid cylinders: formation by fusion of unilamellar lipid vesicles. – *Biochim. Biophys. Acta.*, 1975, **394**(32), 483–491.
- [71] Qiu, H. and M. Caffrey. Phase properties of the monoolein/water system: metastability and equilibrium aspects. – *Biomaterials.*, 2000, **21**, 223–234.
- [72] Radeva, T. and K. Kamburova. Polypeptide multilayer films on colloidal particles: An in situ electro-optical study. – *J. Colloid Interface Sci.*, 2007, **308**(2), 309–317.
- [73] Seddon, J. M. Structure of inverted hexagonal (H_{II}) phases and non-bilayer phase transition of lipids. – *Biochim. Biophys. Acta.*, 1990, **1031**, 1–69.
- [74] Seddon, J. M. and R. H. Templer. Cubic phases of self-assembled amphiphilic aggregates. – *Phil. Trans. R. Soc. Lond.: Phys. Sci. Eng.*, 1993, **344**(1672), 377–401.
- [75] Shearman, G. C., O. Ces, R. H. Templer and J. M. Seddon. Inverse lyotropic phases of lipids and membrane curvature. – *J. Phys.: Condens. Matter.*, 2006, **18**, S1105–S1124.
- [76] Shehata, T., K. Ogawara, K. Higaki, and T. Kimura. Prolongation of residence time of liposome by surface-modification with mixture of hydrophilic polymers. – *Int. J. Pharm.*, 2008, **359**, 272–279.
- [77] Siekmann, B., H. Bunjes, M. H. J. Koch, and K. Westesen. Preparation and structural investigations of colloidal dispersions prepared from cubic monoglyceride–water phases. – *Int. J. Pharm.*, 2002, **244**, 33–43.
- [78] Spicer, P. T., K. L. Hayden, M. L. Lynch, A. Ofori-Boateng, and J. L. Burns. Novel process for producing cubic liquid crystalline nanoparticles (cubosomes). – *Langmuir.*, 2001, **17**, 5748–5756.

- [79] Spicer, P. T. Progress in liquid crystalline dispersions: Cubosomes. – *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2005, **10**, 274–279.
- [80] Tanford, C. The hydrophobic effect and the organization of living matter. – *Science.*, 1978, **200**(4345), 1012–1018.
- [81] Tresset, G. The multiple faces of self-assembled lipidic systems. – *PMC Biophysics.*, 2009, **2**, 3, doi:10.1186/1757-5036-2-3.
- [82] Woodle, M. C. and D. D. Lasic. Sterically stabilized liposomes. – *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.*, 1992, **1113**, 171–199.
- [83] Yagmur, A., L. de Campo, S. Salentinig, L. Sagalowicz, M. E. Leser, and O. Glatter. Oil-loaded monolinolein-based particles with confined inverse discontinuous cubic structure (Fd3m). – *Langmuir.*, 2006, **22**, 517–521.
- [84] Yanagisawa, M., M. Imai, T. Taniguchi. Shape Deformation of Ternary Vesicles Coupled with Phase Separation. – *Phys. Rev. Lett.*, 2008, **100**, 148102-1-4.
- [85] Zarif, L. Elongated supramolecular assemblies in drug delivery. – *J. Controlled Release.*, 2002, **81**, 7–23.
- [86] Zarif, L. and D. S. Perlin. Amphotericin B nanocochleates: From formulation to cochleate technology. – *Drug Delivery Technology.*, 2002, **2**, 4, 1–4.