

Liposomy – postać modyfikująca transport substancji aktywnych przez skórę

Część 2. Zastosowanie w transporcie leków o działaniu ogólnoustrojowym

Liposomes – structure modifying transport of active substances through the skin
Part 2. Application in the transport of drugs with systemic activity

Beata Sarecka-Hujar, Andrzej Jankowski, Joanna Wysocka

STRESZCZENIE

Stosowanie liposomów w farmacji i medycynie, jako nośników substancji leczniczych jest postulowane od lat sześćdziesiątych ubiegłego wieku, kiedy poznano zjawisko zamykania niektórych związków chemicznych w mikropęcherzykach lipidowych. Ostatnie dane literaturowe wskazują na terapeutyczną skuteczność tego sposobu podawania substancji farmaceutycznych, wprowadzono też do lecznictwa pierwsze liposomalne formy leków. Liposomy jednokompartментowe zbudowane są z pojedynczej otoczki, złożonej z podwójnej warstwy lipidowej. W liposomach wielokompartментowych błony lipidowe układają się koncentrycznie na przemian z warstwami wody. Substancja lecznicza, zależnie od rozpuszczalności, umiejscowiona jest w warstwie wodnej lub lipidowej liposomu.

Celem pracy była ocena efektywności transportu przez skórę liposomalnych form leków o działaniu ogólnoustrojowym w porównaniu z lekami stosowanymi w standardowych postaciach.

Liposomy mogą być nośnikami leków o działaniu zarówno miejscowym, jak i ogólnoustrojowym. Ogólnoustrojowo mogą być stosowane leki o działaniu: cytostatycznym, przeciwbólowym, przeciwhistaminowym, przeciwwirusowym, blokującym receptory β -adrenergiczne, immunosupresyjnym, a także leki o charakterze hormonalnym. Podobnie jak w przypadku stosowania liposomalnych form leków o działaniu miejscowym, wyniki badań przeprowadzanych na substancjach leczniczych o działaniu ogólnoustrojowym wskazują, że liposomalne postacie są znacznie efektywniejsze niż standardowe formy leków powszechnie stosowanych. Zastosowanie liposomów jako nośników substancji aktywnych daje możliwość podania mniejszej dawki leku, przyczyniając się równocześnie do obniżenia jego toksyczności. W chorobach nowotworowych liposomalne

Zakład Technologii Postaci Leku
Katedry Farmacji Stosowanej
Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w
Katowicach

ADRES

DO KORESPONDENCJI:

Dr n. med. Beata Sarecka-Hujar
Zakład Technologii Postaci Leku
Katedry Farmacji Stosowanej
Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach
ul. Kasztanowa 3
41-200 Sosnowiec
tel: +48 32 269 98 20
e-mail: beatasarecka@poczta.onet.pl

Ann. Acad. Med. Siles. 2011, 65, 4, 45–50
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach
ISSN 0208-5607

formy cytostatyków minimalizują powstałe podczas chemioterapii uszkodzenia niezmiennych komórek i tkanek.

SŁOWA KLUCZOWE

liposomy, transport przez skórę, leki o działaniu ogólnoustrojowym

ABSTRACT

The use of liposomes in pharmacy and medicine, as carriers of therapeutic substances, was postulated since the 60's last century, when phenomenon of the closing of certain chemical compounds in lipid microvessicle was found. Recent literature data indicated that the therapeutic effectiveness of this method of administration of pharmaceutical substances is suitable. First liposomal forms of drugs were introduced already to the treatment. Liposomes with single compartment are composed of a single envelope, consisting of a lipid bilayer. In the liposomes with multi-compartments lipid membranes are arranged concentrically with alternating layers of water. Drug substance, depending on the solubility, is located in the water layer or the lipid layer of the liposome. The aim of this study was to assess the efficiency of transport through the skin the liposomal forms of drugs with systemic activity compared to drugs used in standard forms.

Liposomes can be used as carriers of drugs with systemic activity e.g.: cytostatics, analgetics, anti-histamines, antiviral, substances of hormonal nature, β -blockers and immunosuppressive drugs. As in the case of application liposomal forms of drugs with local activity, literature data conducted on substances with systemic activity indicated that the liposomal forms are much more efficient than standard forms of commonly used drugs. Application of liposomes as carriers of drugs allows using the lower dose of the drug, and leads to a reduction of its toxicity. The damages incurred in the unchanged cells and tissues were significantly minimized when the liposomal form of cancer cytostatics was used.

KEY WORDS

liposomes, transport through the skin, drugs with systemic activity

LIPOSOMY – WŁAŚCIWOŚCI I METODY OTRZYMYWANIA

Liposomy to sferyczne lub owalne struktury wodno-lipidowe, stanowiące mikrorezerwuar substancji leczniczej o wymiarach od 0,01 do 1,0 μm . Z uwagi na wielkość pęcherzyków oraz liczbę warstw otoczki, dzieli się je na jedno- i wielowarstwowe. Liposomy jednowarstwowe: małe (SUV 20–50 nm) i duże (LUV > 100 nm), stosowane jako nośniki substancji aktywnych, zawierają pojedynczą otoczkę złożoną z podwójnej warstwy lipidowej, określane są skrótem ULV i obejmują szeroki zakres wielkości od 20 do 1000 nm.

W trakcie wytwarzania liposomów pojawiają się również liposomy wielokompartментowe, zawierające kilkuwarstwowe pęcherzyki o wymiarach 0,1–10 μm . Błony lipidowe układają

się koncentrycznie na przemian z warstwami wody, a substancja lecznicza, zależnie od rozpuszczalności, umiejscowiona jest w warstwie wodnej lub lipidowej liposomu.

Najważniejszymi komponentami lipidowymi do otrzymywania liposomów są lecytyny, sfingolipidy oraz lipidy obojętne. Od momentu odkrycia liposomów opracowano wiele metod ich otrzymywania. Najprostszy sposób, przedstawiony przez Benghama i wsp. [1], polega na rozpuszczaniu komponentów lipidowych w odpowiedniej ilości rozpuszczalnika organicznego, a następnie odparowaniu rozpuszczalnika w trakcie ręcznego wytrząsania. W wyniku zastosowania tej metody otrzymuje się głównie liposomy wielowarstwowe o różnej wielkości.

Inne, nowsze sposoby otrzymywania liposomów to m.in.: wstrzyknięcia etanolowego we-

dług Batzri i Korn [2], wstrzyknięcia eterowego według Deamera i Banghama [3], odparowywania faz odwróconych [4] oraz otrzymywania wielowarstwowych liposomów przez dehydratację-rehydratację [5].

Metody te pozwalają otrzymać mieszaninę liposomów jedno- i wielowarstwowych o różnej wielkości. Skuteczna terapia wymaga zastosowania standaryzowanych jedno-warstwowych liposomów o określonej wielkości. Liposomy jednowarstwowe otrzymuje się z liposomów wielowarstwowych działaniem ultradźwięków, metodą ekstruzji, homogenizacji oraz wstrzykiwania eterowych lub etanolowych roztworów lipidów do fazy wodnej [6].

Ze względu na właściwości można wyróżnić następujące typy liposomów:

- konwencjonalne, zbudowane z naturalnych cząsteczek lipidów, np. fosfolipidów,
- kationowe, zawierające substancje amfifilowe z grupą hydrofilową o charakterze kationowym (liposomy te okazały się efektywne jako nośniki m.in. kwasów nukleinowych do komórek ssaków) [7],
- elastyczne, zawierające aktywator krawędzi (*edge activator*) oraz transferosomy, odmiana liposomów elastycznych, zawierająca: 65–87% lipidów, 10–25% surfaktantów (np. tweed 80, span-80) i 3–10% etanolu [8],
- ethosomy, zawierające alkohol w wysokim stężeniu [8],
- niosomy, zbudowane z niejonowych związków amfifilowych [9].

Penetracja liposomów w głąb skóry zależy od ich rodzaju: liposomy ciekłe penetrują do bardzo głębokich warstw skóry, liposomy z fosfatydylocholiną (DMPC) penetrują wyższe warstwy skóry, natomiast liposomy uwodnione pozostają na powierzchni skóry. W celu przedłużenia czasu przebywania w krążeniu, liposomy można otrzymywać jako pochodne kowalennie związane z polietylenoglikolem (PEG). Tak zmodyfikowane liposomy określane są jako *stealth* liposomy [10].

Celem pracy była ocena efektywności transportu przez skórę form liposomalnych leków o działaniu ogólnoustrojowym w porównaniu z lekami stosowanymi w postaciach standardowych. Praca ta jest kontynuacją rozważań dotyczących możliwości zastosowania liposomów jako postaci zawierającej substancję leczniczą o działaniu miejscowym, opisanych w pierwszej części naszego opracowania [11].

FORMY LIPOSOMALNE SUBSTANCJI AKTYWNYCH O DZIAŁANIU OGÓLNOUSTROJOWYM

Oprócz stosowania w terapii miejscowej liposomy mogą być wykorzystywane także w terapii trans-dermalnej, jako nośniki leków o działaniu ogólnoustrojowym. Zaaplikowane na skórę, penetrują przez warstwy naskórka, skórę właściwą, ulegając w konsekwencji absorpcji do krwiobiegu lub naczyń limfatycznych, a z krwią do tkanek docelowych. Wśród leków o działaniu ogólnoustrojowym, podawanych w formie liposomalnej na skórę, na szczególną uwagę zasługują leki cytostatyczne, dające szansę dotarcia liposomów docelowo do komórek nowotworowych. Inne leki stosowane ogólnoustrojowo to leki przeciwbólowe, przeciwhistaminowe, przeciwwirusowe, substancje o charakterze hormonalnym, β -blokery oraz leki immunosupresyjne.

Cytostatyki w formie liposomalnej aplikowanej na skórę są stosowane w terapii różnego typu nowotworów. Umieszczenie toksycznych chemioterapeutyków w liposomach umożliwia osiągnięcie komórek nowotworowych, z ominięciem wielu skutków ubocznych, które towarzyszą zwykle leczeniu, m.in. niweluje możliwość uszkodzenia niezmiennych chorobowo komórek i tkanek. Enkapsulacja pozwala także na kontrolowane uwalnianie cytostatyków w miejscu docelowym oraz krążenie w organizmie z minimalizacją strat wynikających z metabolizmu i wydalania leku z ustroju.

Yarosh i wsp. [12] przeprowadzili badania z wykorzystaniem specyficznego enzymu – T4 endonukleazy V, naprawiającego uszkodzenia DNA w postaci cyklobutanowych dimerów pirymidynowych (CPD – *cyclobutane pyrimidine dimers*). Enzym ten został umieszczony w liposomach, a następnie zaaplikowany na skórę myszy oraz na kultury komórek skóry ludzkiej [12]. Myszy traktowane liposomalną formą enzymu wykazywały zależne od dawki obniżenie liczby zmian nowotworowych raka kolczystokomórkowego (*squamous cell carcinoma*) w porównaniu z kontrolą. Wykazano, że T4 endonukleaza V dostarczana do komórek skóry ssaków w liposomach zwiększa usuwanie uszkodzeń CPD z DNA i redukuje liczbę zmian nowotworowych u myszy naświetlanych promieniami UV [12]. Na etapie opracowania są także nowe rozwiązania dotyczące zastosowania liposomów w terapii melanomy, w celu zwiększenia efektywności dostarczania leków do komórek docelowych [13].

Metotreksat, antagonist kwasu foliowego, hamuje reduktazę dihydrofolianową (DHFR), co skutkuje zaburzeniem syntezy kwasu nukleinowego w komórkach szybko rosnących, m.in. w komórkach nowotworowych. Ponadto wykazuje niewielkie działanie immunosupresyjne. Jest stosowany w leczeniu różnego typu nowotworów: białaczki limfoblastycznej, nabłonka komórkowego złośliwego, raka szyi, piersi, jajnika, głowy. W terapii łuszczycy powoduje hamowanie wzrostu nabłonka skóry. W badaniach dotyczących nowych rozwiązań w leczeniu raka piersi Tan i wsp. [14] opracowali liposomalną postać nowego inhibitora reduktazy dihydrofolianowej – M-V-05. Postać ta okazała się bardziej efektywna niż standardowy metotreksat, a jej aktywność była porównywalna z liposomalną formą dokso-rubicyny. Liposomalna postać M-V-05 wydaje się obiecującym czynnikiem terapeutycznym i może być stosowana w terapii wspomagającej leczenie raka piersi [14].

Z grupy środków przeciwzapalnych i przeciwbólowych o działaniu ogólnoustrojowym używana jest liposomalna postać brucyny, stosowana w terapii transdermalnej w celu zmniejszenia bólów reumatycznych i urazowych. W badaniach *in vitro* wykazano, że mniej niż 68% brucyny enkapsulowanej do liposomów zostało uwolnione w czasie 10 godzin [15]. Stwierdzono ponadto, że brucyna umieszczona w liposomach wykazywała – w porównaniu z wolną brucyną – większą zdolność do przenikania przez skórę, a także mniejszą kumulację w tkankach oraz samych warstwach skórnych. Zaobserwowano, że zarówno aktywność przeciwzapalna, jak i efekty przeciwbólowe liposomalnej brucyny w tkankach podskórnych są znacząco wyższe i utrzymują się dłużej niż po zastosowaniu wolnej formy leku. Dane te potwierdzają również późniejsze doniesienia demonstrujące wyższą skuteczność liposomalnej postaci brucyny w hydrożelu w porównaniu z „wolną” brucyną zawartą w hydrożelu [16].

W przypadku leków przeciwwirusowych w formie liposomalnej stosowany jest acyklowir, pochodna deoksygwanozyny. Jain i wsp. [17] w swoich badaniach wykorzystali elastyczne liposomy do przez skórę podania acyklowiru sodowego. Lek po aplikacji penetrował przez doświadczone błony i skórę szczurów, wywierając działanie ogólnoustrojowe. Obserwowany „przepływ” elastycznych

liposomów z lekiem był odpowiednio dwu- i prawie sześciokrotnie wyższy niż konwencjonalnych liposomów z acyklovirem sodowym i standardowego leku. Badania *in vivo* wykazały, że przy aplikacji liposomów elastycznych zawierających acyklovir, jego koncentracja w osoczu po 24 godzinach wynosi $105 \pm 9, 4$ ng/ml, co stanowi czterokrotnie większą wartość niż w przypadku liposomów konwencjonalnych [17].

W terapii transdermalnej stosuje się także wiele substancji o charakterze hormonalnym. Wśród hormonów enkapsulowanych w liposomach aplikowanych na skórę wyróżnia się m.in. estradiol, testosteron, insulinę oraz melatoninę.

Leczenie egzogennym testosteronem polega na zwiększeniu i utrzymaniu fizjologicznego poziomu hormonu w surowicy [18]. Często wybieraną formą leczenia w tym przypadku jest terapia transdermalna. Niestety, przy obecnie dostępnych preparatach, do osiągnięcia wymaganego stężenia hormonu we krwi niezbędna jest aplikacja na dość dużej powierzchni skóry, co znacznie ogranicza komfort leczenia. Ainbinder i wsp. [19] opracowali ethosomalną postać testosteronu, a następnie zbadali przenikanie tej formy przez warstwy skóry szczurzej za pomocą mikroskopii skaningowej, porównując je przy tym z przenikaniem w przypadku zastosowania standardowego żelu z testosteronem (AndroGel®). Ocenili również stopień przenikania testosteronu przez skórę człowieka. Wyniki wskazują, że zaaplikowanie preparatu z ethosomalnym hormonem na fragment skóry o powierzchni 40 cm^2 , powoduje odpowiedni stopień przenikania i wzrost stężenia testosteronu w osoczu do wartości fizjologicznej. Powierzchnia ta jest 10 razy mniejsza niż przy użyciu standardowego żelu (wolna forma hormonu). Autorzy sugerują, że zastosowanie ethosomów zwiększa wchłanianie testosteronu przez skórę i może być wykorzystane do projektowania nowoczesnych preparatów transdermalnych [19].

W innych badaniach porównano penetrację różnych form estradiolu przez ludzki naskórek [20]. Wykorzystano w nich konwencjonalne liposomy oraz transferosomy, do których inkorporowano estradiol, a także nasycony wodny roztwór estradiolu, jako kontrolę. Essa i wsp. wykazali wzrost penetracji przez skórę estradiolu umieszczonego w liposomach, w porównaniu z kontrolą. Stwierdzono również zwiększony stopień przenikania transfero-

somów w porównaniu z liposomami konwencjonalnymi przy zastosowaniu jontoforezy. Połączenie dwóch metod: elektroporacji i jontoforezy przyczyniło się jedynie do niewielkiej poprawy przenikania transferosomów przez skórę. Wyniki wskazują na znaczną przewagę formy liposomalnej nad „wolną” postacią estradiolu [20].

Badania z użyciem transferosomów, jako nośników insuliny w terapii cukrzycy typu 1, przeprowadzili Cevc i wsp. [21]. Zaobserwowali oni, że hormon inkorporowany do elastycznych liposomów i zaaplikowany na skórę charakteryzował się biodostępnością większą o 50%, niż po przezskórnej iniekcji insuliny. Wyniki tych badań wykazały, że podanie insuliny transdermalnie na skórę o powierzchni 40 cm² zapewnia optymalne stężenie hormonu w surowicy przez 12 godzin i wywołuje pożądany efekt terapeutyczny u chorych z cukrzycą typu 1 [21]. Eksperymenty przeprowadzone na myszach sugerują, że liposomy elastyczne mogą się stać obiecującym nośnikiem hydrofilowych peptydów, w tym insuliny w terapii transdermalnej [22]. Badania te wykazały, że elastyczne liposomy zawierające insulinę, zaaplikowane na skórę myszy w okolicy brzucha w ilości 0,90 IU/cm² powodują procentowe obniżenie poziomu glukozy o 21,42 ± 10,19% w ciągu 1 godziny, osiągając spadek o 61,48 ± 8,97% w czasie 5 godzin. Równocześnie autorzy zademonstrowali, że transdermalna aplikacja konwencjonalnych liposomów oraz roztworu insuliny nie wpływa na efekt hipoglikemiczny [22].

Doskonałym miejscem podania wielu substancji leczniczych jest skóra, największy narząd naszego organizmu. Wyniki badań prowadzonych w wielu ośrodkach naukowych świata wskazuje, że liposomalne postacie leków zarówno o działaniu miejscowym jak i ogólnoustrojowym charakteryzują się większą efektywnością w porównaniu do standartowych, powszechnie stosowanych form tych leków.

Liposomy mają zdolność wnikania w głębsze warstwy skóry, z reguły niedostępne dla form tradycyjnych, zwiększają także dostępność biologiczną. Zastosowanie liposomów jako nośników daje możliwość podania mniejszej dawki leku, przyczyniając się jednocześnie do obniżenia jego toksyczności. W chorobach nowotworowych liposomalne formy cytostatyków umożliwiają osiągnięcie komórek nowotworowych z kontrolowanym uwalnianiem leku, a jednocześnie minimalizują powstałe podczas chemioterapii uszkodzenia zdrowych komórek i tkanek.

Zastosowanie liposomów jako nośników substancji leczniczej nie wyczerpuje możliwości aplikacyjnych tej mikropostaci. Stanowią one również przedmiot zainteresowania nowoczesnej bioinżynierii, gdzie wykorzystywane są głównie jako nośniki DNA. Enkapsulacja cząsteczek DNA wraz z genem terapeutycznym pozwala na dostarczenie go do komórek docelowych, wytwarzających enzymy naprawcze, co umożliwi prowadzenie terapii przyczynowej.

PIŚMIENNICTWO

- Bangham A.D., Hill M.W., Miller N.G. Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. *Meth. Membrane Biol.* 1974; 1: 1–68.
- Batzri S., Korn E.D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim. Biophys. Acta* 1973; 298: 1015–1019.
- Deamer P.W., Bangham A.D. Large-volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochim. Biophys. Acta* 1976; 443: 629–634.
- Szoka F., Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978; 75: 4194–4198.
- Shew R.L., Deamer D.W. A novel method for encapsulation of macromolecules in liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1985; 816: 1–10.
- Mayer L.D., Hope M.J., Cullis P.R. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim. Biophys. Acta* 1986; 858: 161–168.
- Stebelska K., Wyrozumska P., Gubernator J., Sikorski A.F. Highly fusogenic cationic liposomes transiently permeabilize the plasma membrane of HeLa cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2007; 12: 39–50.
- Pirvu C., Hlevca C., Ortan A., Prisada R. Elastic vesicles as drugs carriers through the skin. *Farmacia* 2010; 58: 128–135.
- Benson H.A.E. Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques. *Curr. Drug Deliv.* 2005; 2: 23–33.
- Lasic D.D., Martin F. *Stealth liposomes*. CRC Press Boca Raton, 1995.
- Jankowski A., Sarecka-Hujar B., Wysocka J. Liposomy – postać modyfikująca transport substancji aktywnych przez skórę. Część 1. Zastosowanie w transporcie leków o działaniu miejscowym. *Ann. Acad. Med. Siles.* 2011; 4.
- Yarosh D., Alas L.G., Yee V. i wsp. Pyrimidine dimer removal enhanced by DNA repair liposomes reduces the incidence of UV skin cancer in mice. *Cancer Res.* 1992; 52: 4227–4231.
- Tran M.A., Watts R.J., Robertson G.P. Use of liposomes as drug delivery vehicles for treatment of melanoma. *Pigment Cell. Melanoma Res.* 2009; 22: 388–399.
- Tan B.J., Quek K.S., Wong M.Y., Chui W.K., Chiu G.N. Liposomal M-V-05: formulation development and activity testing of a novel dihydrofolate reductase inhibi-

tor for breast cancer therapy. *Int. J. Oncol.* 2010; 37: 211–218.

15. Qin X.Q., Yuan Y., Liu C.S., Wang Q.Y., Shen X., Yang B.C. Preparation of liposomal brucine and its pharmaceutical/pharmacodynamic characterization. *Acta Pharmacol. Sin.* 2007; 28: 1851–1858.

16. Wang J., Yuan Y., Liu C., Zhu D., Shen X., Yang B. Preparation and pharmaceutical/pharmacodynamic evaluation of topical brucine-loaded liposomal hydrogel. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2009; 20: 2075–2084.

17. Jain S.K., Gupta Y., Jain A., Rai K. Enhanced transdermal delivery of acyclovir sodium via elastic liposomes. *Drug Deliv.* 2008; 15: 141–147.

18. Hanecki R. Zespół niedoboru testosteronu – rozpoznanie i leczenie. *Przegl. Menop.* 2008; 3: 138–143.

19. Ainbinder R., Touitou E. Testosterone ethosomes for enhanced transdermal delivery. *Drug Deliv.* 2005; 12: 297–303.

20. Essa E., Bonner M., Barry B. Electrically assisted skin delivery of liposomal estra-

diol; phospholipid as damage retardant. *J. Control. Release* 2004; 95: 535–546.

21. Cevc G., Gebauer D., Stieber J., Schatzlein A., Blume G. Ultraflexible vesicles, transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998; 1368: 201–215.

22. Guo J., Ping Q., Zhang L. Transdermal delivery of insulin in mice by using lecithin vesicles as a carrier. *Drug Deliv.* 2000; 7: 113–116.