

ФОСФОЛИПИДЫ В БИОТЕХНОЛОГИЯХ

В.И. Швец, заведующий кафедрой

кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова

e-mail: biotechnology@mtu-net.ru

И зложены современные представления о химическом и ферментативном синтезе, выделении из природных источников, создании промышленных технологий получения фосфолипидов различных молекулярных видов. Приведены данные об их строении, биологической активности и возможности использования для получения липосомальных форм лекарственных препаратов.

The review describes modern concepts of chemical and enzymatic synthesis, isolation of substances from natural sources, and creation of industrial technologies for obtaining phospholipids of various molecular types. Data on their structures, biological activities, and the possibility of using them for the preparation of liposomal forms of drugs are presented

Ключевые слова: фосфолипиды, химический и биотехнологический синтез, биологические мембраны, физиологическая роль фосфолипидов, фосфоинозитидный цикл, наноструктуры, липосомальные лекарственные препараты, медицинская биотехнология.

Keywords: phospholipids, chemical and biotechnological synthesis, biological membranes, physiological role of phospholipids, phosphoinositide cycle, nanostructures, liposomal pharmaceutical preparations, medicinal biotechnology

В последнее время во многих исследовательских центрах развернут широкий фронт работ фундаментального и прикладного характера, направленных на всестороннее изучение обширной группы природных биологически активных соединений, объединенных общим названием «фосфолипиды». Представления, основанные на результатах структурно-функциональных исследований, отводят им, а также их надмолекулярным клеточным образованиям – биологическим мембранам – важнейшую роль в функционировании биохимических механизмов, определяющих физиологическое состояние клетки, ее реакции и взаимодействие как с соседними клетками, так и с факторами окружающей среды [1, 2]. И как следствие, для успешного развития медицинской биотехнологии необходимо тщательное изучение и определение роли фосфолипидов в соответствующих разделах наук, относящихся к живым системам, таких как биология, биохимия, биофизика, иммунология, физиология, фармакология и др. В прикладном аспекте это явилось основой того, что определенные типы фосфолипидов, их фрагменты и модифицированные синтетические аналоги привлекают внимание исследователей как перспективный источник для конструирования диагностических и лекарственных препаратов и их использования в практической медицине [2, 3].

Среди множества соединений этого класса наиболее значимыми являются фосфо- и гликофосфолипиды. (схема 1). Эти вещества, хотя и в небольших количествах, распространены в клетках органов и тканей организмов всех типов, причем их повышенные концентрации наблюдаются в таких

органах, как головной и спинной мозг, сердечная мышца, печень, легкие и др. [2]. Структура фосфолипидов характеризуется присутствием гидрофобных и гидрофильных фрагментов в составе одной молекулы, а также разнообразием строения каждого из этих фрагментов, что в значительной степени определяет роль фосфолипидов в целом ряде клеточных процессов [1, 2]. Применение фосфолипидов для целей практической медицины основано на их биологической значимости и проводится с учетом конкретного вида функциональной активности, проявляемой тем или иным типом фосфолипидов в биологических системах [2, 3].

Препараты фосфолипидной природы начинают осваиваться в медицинской практике, поэтому для данного нового класса лекарственных веществ актуальным является вопрос о сырьевых источниках и методах получения фосфолипидов [2, 3].

В настоящее время существует два подхода к решению проблем доступности этих соединений. Во-первых, химический или биотехнологический (ферментативный) синтезы (и сочетание этих методов), исходя из низкомолекулярных соединений. Во-вторых, выделение фосфолипидных фракций и их смесей из природного сырья с использованием биотехнологических приемов.

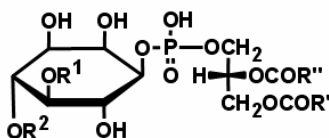
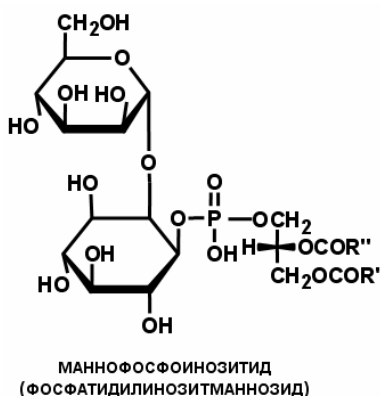
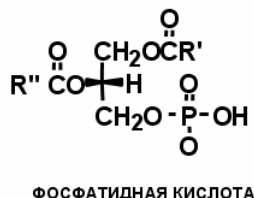
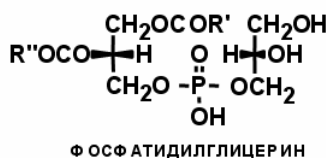
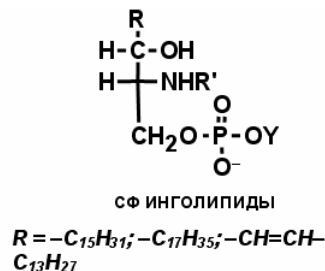
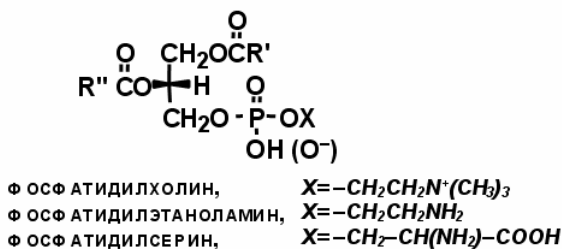
Синтетические исследования в ряду фосфолипидов проводятся на протяжении многих лет. В ходе этих работ классическими методами биоорганической химии осуществлены синтезы фосфолипидов всех структурных типов [1].

Настоящий обзор создан на основе заказного доклада на пленарном заседании «Фундаментальные исследования и биотехнология» на Пятом Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития», состоявшемся 16–20 марта 2009 года.

Так, нами реализованы в пионерском плане синтеза всех представителей фосфоинозитидов: фосфатидилинозита, фосфатидилинозит фосфата, фосфатидилинозит дифосфата, а также продукта ферментативного отщепления остатка диацилглицерина от молекулы трифосфоинозиотида – 1,4,5-трифосфата *мио*-инозита – известного внутриклеточного передатчика в регуляторном цикле фосфо-

инозитидов [1, 4–7].

При этом решены принципиальные в этой области биоорганической химии вопросы: создание фосфоэфирных связей фосфолипидов [6] и получение энантиомеров асимметрично замещенных производных глицерина и *мио*-инозита [1, 5], которые являются структурной основой этих фосфолипидов.



МОНОФОСФОИНОЗИТИД (ФОСФАТИДИЛИНОЗИТ), $R^1=R^2=H$
ДИФОСФОИНОЗИТИД (ФОСФАТИДИЛИНОЗИТ ФОСФАТ), $R^1=H_2PO_3$, $R^2=H$
ТРИФОСФОИНОЗИТИД (ФОСФАТИДИЛИНОЗИТ ДИФОСФАТ), $R^1=R^2=H_2PO_3$

R' и R'' — остатки высших жирных кислот

Схема 1. Основные типы природных фосфолипидов.

Впервые нами осуществлен синтез инозитсодержащего гликофосфолипида – фосфатидилинозитманнозида [8].

Подобным образом мы также впервые синтезировали маннозид церамид фос-

фоинозита (схема 2) [9]. Оба гликофосфоинозита – это известные специфические антигенные гликолипиды из фосфолипидного пула патогенных штаммов микобактерий [8].

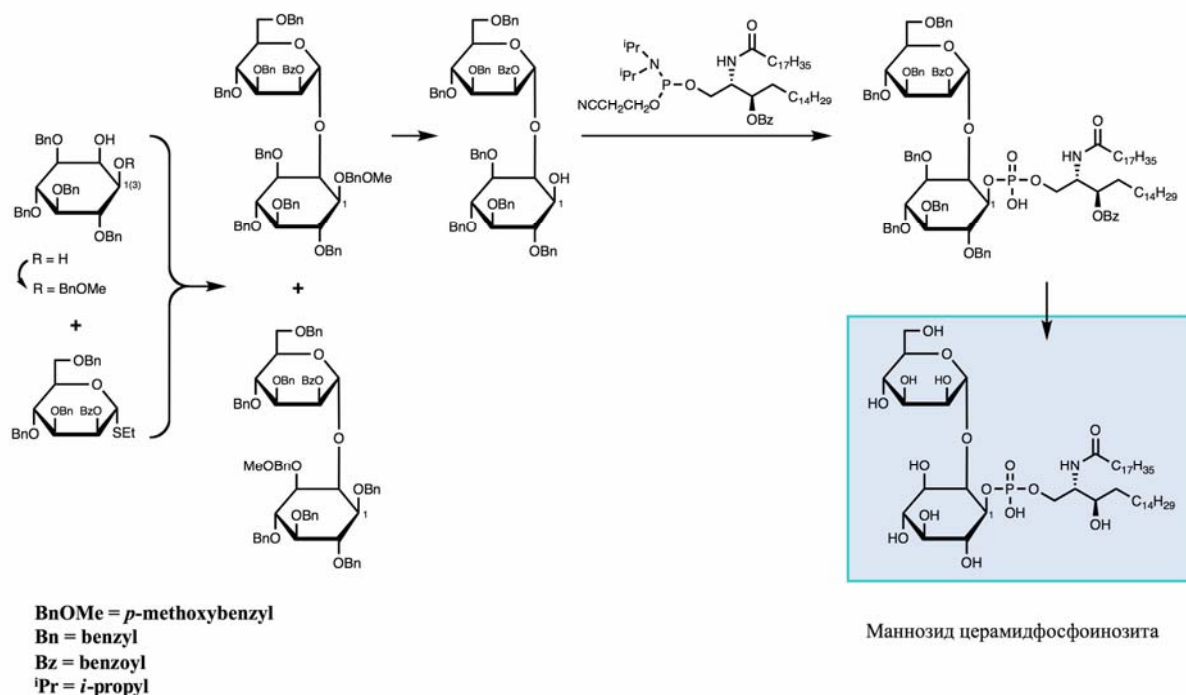


Схема 2. Синтез маннозида церамидфосфоинозита.

Также в круг наших интересов был включен недавно открытый вид гликофосфолипидов – гликозилфосфатидилинозиты, обеспечивающие в клетке специфические механизмы функ-

ционирования важнейших мембраноактивных белков. Синтез основного структурного фрагмента этого гликофосфолипида, содержащего остаток аминсахара, показан на схеме 3 [8].

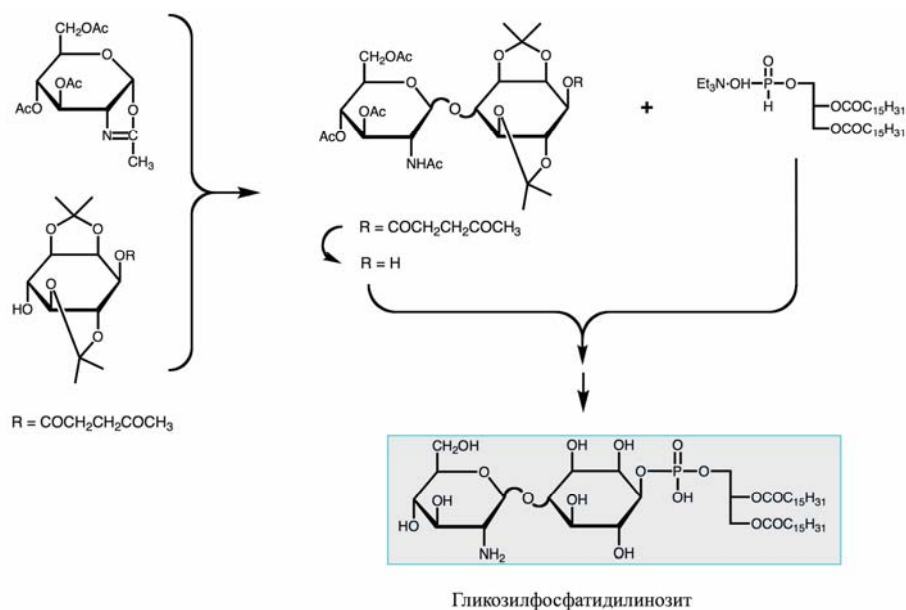
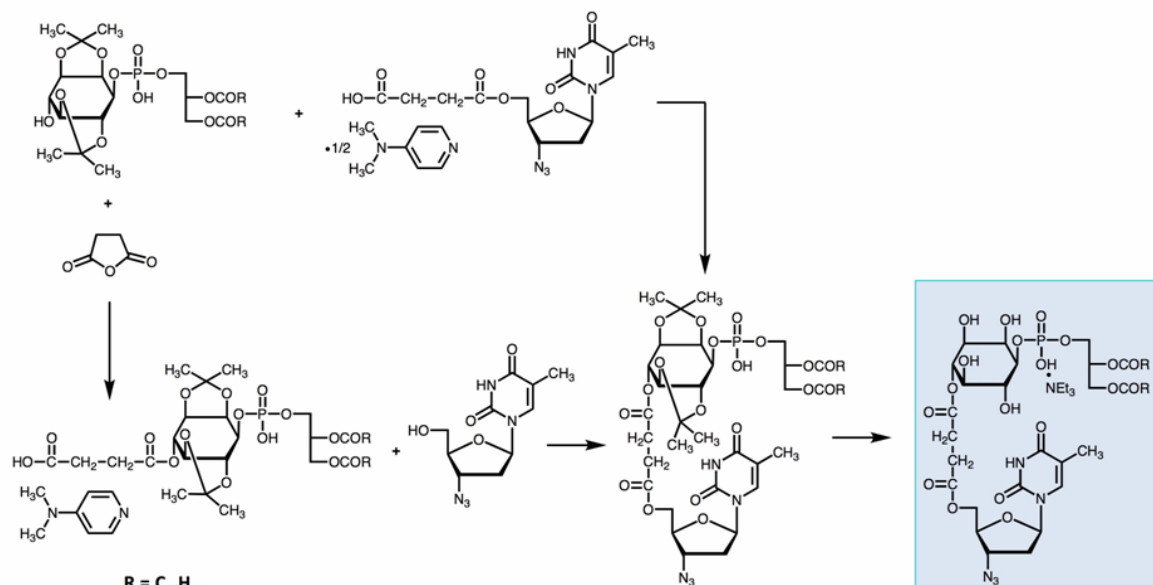


Схема 3. Синтез глюкозаминилфосфатидилинозита.

Прогресс синтетических исследований в области фосфолипидов привел к развитию подходов к получению конъюгатов фосфолипидов с другими биологически активными веществами (например, ретиноидами, нуклеозидами). В рамках этого направления нами проведен синтез серии конъюгатов нуклео-

зидов с фосфатидилинозитом. На схеме 4 показан синтез конъюгата с азидотимидином (известный лекарственный препарат против СПИДа) [8]. Такая модификация повышает противовирусную активность нуклеозидов и улучшает внутриклеточный транспорт этих препаратов.



Конъюгат азидотимидина и фосфатидилинозита

Схема 4. Синтез конъюгата азидотимидина с фосфатидилинозитом.

Более перспективным представляется полусинтетический подход к получению фосфолипидов на основе доступного природного фосфатидилхолина (схема 5). На ключевых стадиях нами использовались ферменты фосфолипидного метаболизма – фосфолипазы

A_2 и D .

Этим методом синтезированы фосфатидная кислота, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, фосфатидилглицерин с различным жирнокислотным составом [1, 4].

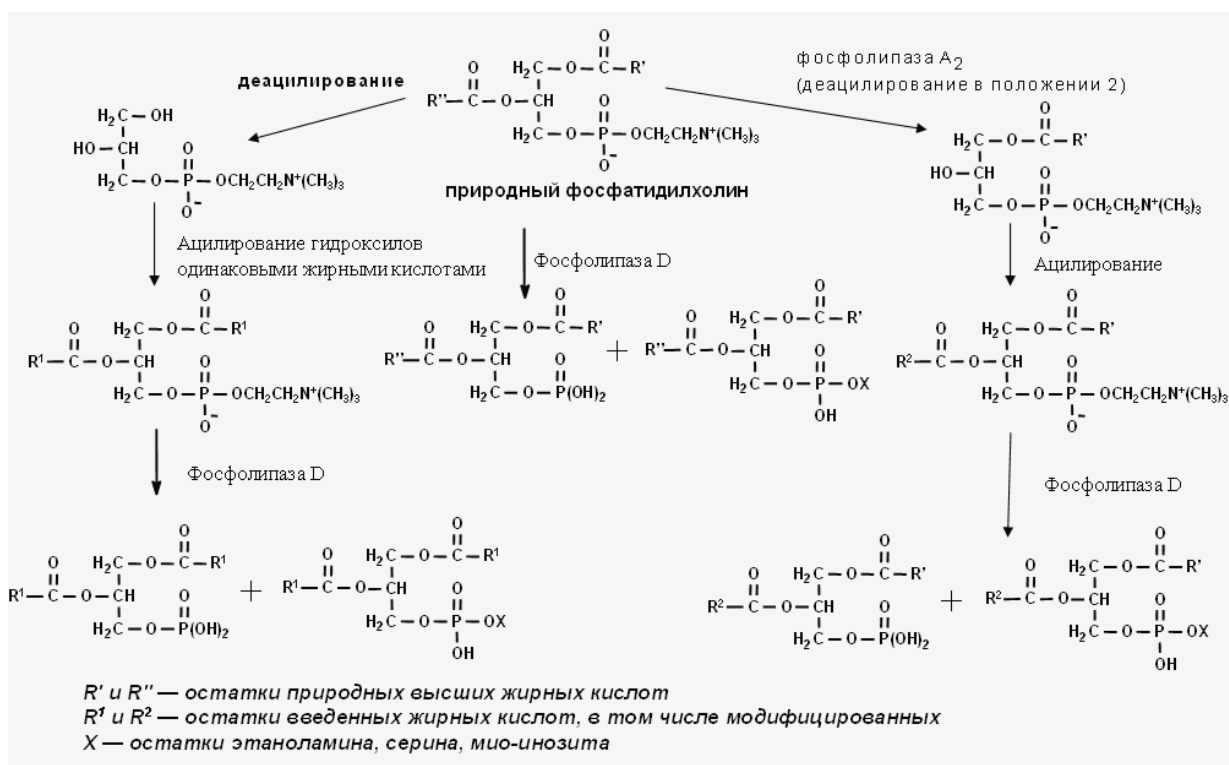


Схема 5. Полусинтетический метод получения фосфолипидов.

Метод оказался успешным для получения фосфолипидов с репортерными группами: с флуоресцентными, спиновыми, фотореактивными и изотопными метками (схема 6) [1, 4]. Эти соединения используются как инструменты в биофизических исследованиях липид-

связанных систем, при изучении различных конструкций, построенных на основе фосфолипидов, создании новых поколений лекарственных препаратов. При этом применяются различные типы спектроскопии: электронная, ИК, ЯМР, ЭПР [1, 2, 4].

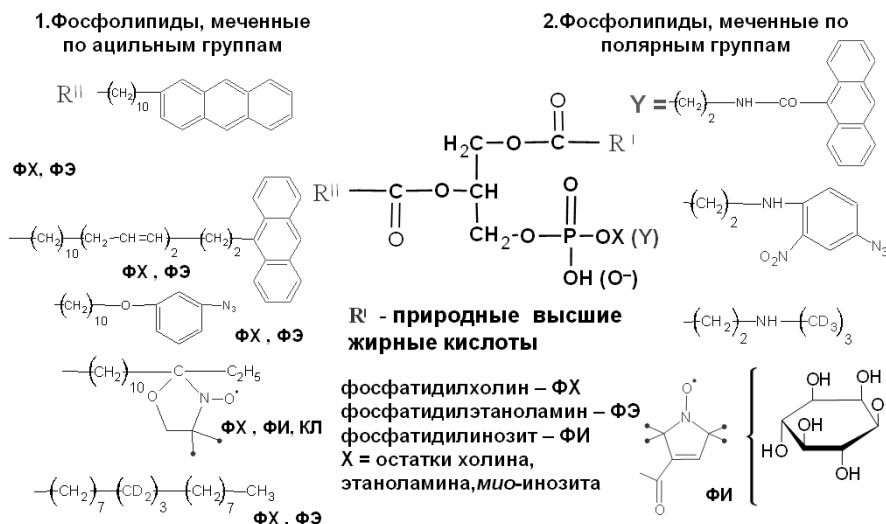


Схема 6. Фосфолипиды с различными метками, синтезированные для использования в биотехнологических и медико-биологических исследованиях.

Другой метод синтеза флуоресцентно-меченных фосфолипидов состоит в модификации природных фосфолипидов по реакции Фриделя-Крафтса с последующим транс-

фосфатилированием в присутствии фосфолипазы D на все возможные полярные компоненты фосфолипидов (схема 7). С помощью этой методологии получен ряд модифицированных фосфолипидов, которые нашли использование при исследовании липидзависимых систем [10–12].

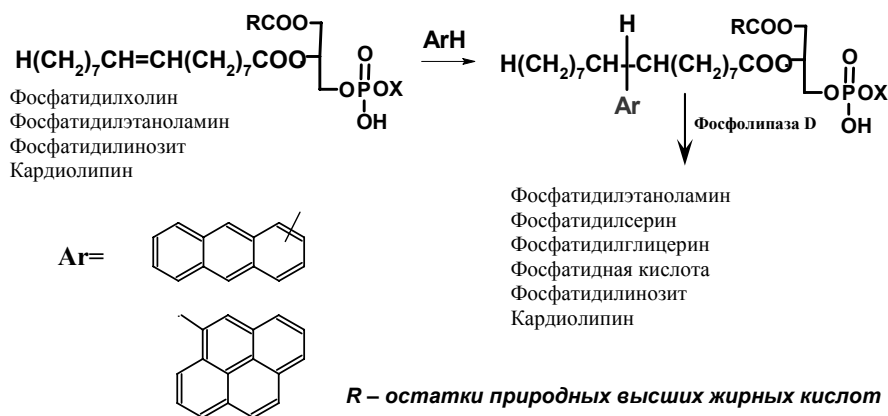


Схема 7. Синтез флуоресцентно-меченных модифицированных фосфолипидов с помощью реакции Фриделя-Крафтса.

Кроме того были получены полимеры, содержащие ароматические группы с присоединенными остатками фосфолипидов (схема 8) [10–12].

Полимеры, модифицированные фосфолипидами, можно использовать в аффинной

хроматографии для выделения белков, ферментов и низкомолекулярных соединений, имеющих сродство к фосфолипидам. Так, полимер с иммобилизованным фосфатидилсеринном применялся для выделения протеинкиназы С.

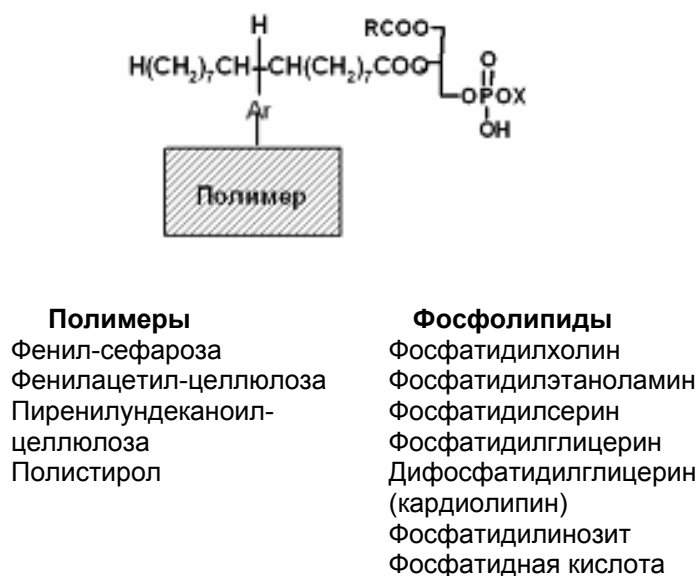
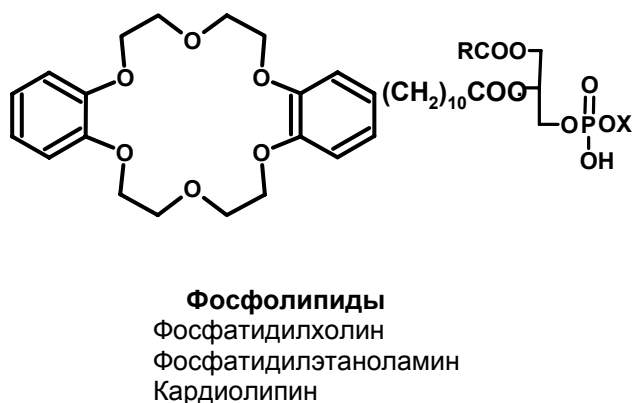


Схема 8. Фосфолипиды, иммобилизованные на арилсодержащих полимерах.

На схеме 9 показано, как с помощью аналогичного приема был получен ионофорный кардиолипин, на основе которого созданы

иммуноспецифичные электроды, использованные для диагностики некоторых заболеваний (красная волчанка, сифилис) [10–12].



R – остатки природных высших жирных кислот

Схема 9. Конъюгаты фосфолипидов и краун-эфира для конструирования иммуноглобулин-селективных электродов.

Синтетические методы получения фосфолипидов дали возможность создать все известные типы этих веществ в индивидуальной форме. Следует отметить, что синтезы отличаются многостадийностью (иногда до 25 стадий), трудоемкостью выделения индивидуальных веществ и завершаются получением целевых соединений в небольших количествах [1]. Препаративное значение этих методов невысоко. Роль этого направления в другом: оно дало возможность решить структурные

проблемы в области фосфолипидов, т.е. задачу окончательного установления их строения, синтезировать модифицированные фосфолипиды [1, 10–13]. Все это позволило связать структуры фосфолипидов с их функциями, предсказывать их биологическое значение, в частности, с помощью компьютерных расчетов.

Задача получения фосфолипидов в препаративных количествах решается выделением их из природных объектов с использованием биотехнологических приемов. Мы участво-

вали в разработке этих приемов. Еще в советские времена на Харьковском предприятии «Биолек» реализованы промышленные методы выделения фосфатидилхолина из яичного желтка (схема 10) и кардиолипина из

сердечной мышцы. Проведены работы, направленные на создание технологий получения фосфолипидных субстанций для конструирования диагностических и лекарственных препаратов [2, 3, 14].

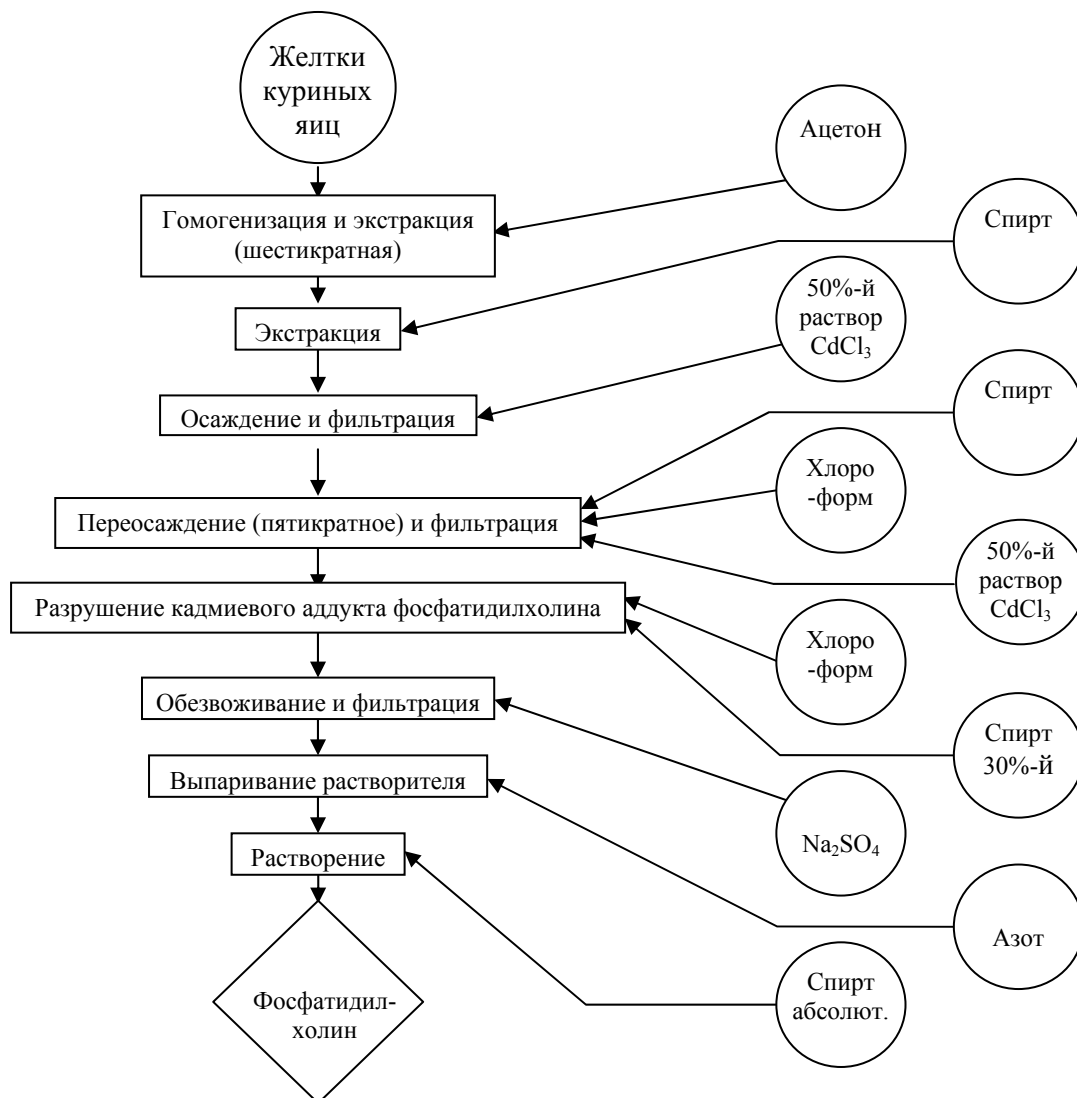


Схема 10. Промышленный способ выделения фосфатидилхолина (лецитина).

В результате освоен промышленный выпуск ряда фосфолипидных фракций (табл. 1).

Помимо перечисленных препаратов производились фосфолипидные фракции из ряда животных, растительных и микробиологических источников. Все эти препараты по качеству не уступают зарубежным, а по стоимости значительно дешевле. Препараты были изучены по всем параметрам. Исследо-

вания включали определение биологической активности, способов стабилизации и длительности хранения, стандартизации физико-химических параметров. Изучено влияние на биологическую активность фосфолипидов строения молекулы и ее заряда, степени ненасыщенности жирнокислотных остатков и продуктов перекисного окисления фосфолипидов и других факторов [2, 3, 14].

Таблица 1. Номенклатура фосфолипидных препаратов, выпускаемых промышленным способом на Харьковском предприятии «Биолек»

№	Фосфолипидный препарат	Источник выделения	Примеси, %	Метод выделения
1	Фосфатидилхолин	Яичный желток	5-8	Осаждение суммарного экстракта липидов солями тяжелых металлов
2	Фосфатидилэтаноламин	Мозг крупного рогатого скота или яичный желток	3-5	Экстракция суммарных фосфолипидов с последующей хроматографической очисткой
3	Фосфатидилсерин	Мозг крупного рогатого скота	3-5	Очистка суммарного экстракта липидов осаждением солями тяжелых металлов с последующей очисткой на DEAE-сефадексе А25
4	Фосфатидилинозит	Пекарские дрожжи	3-6	Экстракция суммарных липидов с последующей очисткой на сорбенте, содержащем аминногруппы
5	Дифосфатидилглицерин	Сердечная мышца крупного рогатого скота	5-10	Осаждение суммарных липидов органическими растворителями и солями тяжелых металлов
6	Сфингомиелин	Мозг крупного рогатого скота	3-5	Экстракция суммарных липидов органическими растворителями с последующей очисткой на силикагеле
7	Фосфатидная кислота	Яичный фосфатидилхолин	2-4	Получена из яичного фосфатидилхолина путем его гидролиза фосфолипазой D
8	Лизофосфатидилхолин	Яичный фосфатидилхолин	2-4	Получен из яичного фосфатидилхолина путем его гидролиза фосфолипазой А2
9	Фракция ганглиозидов	Мозг крупного рогатого скота	3-5	

Далее остановимся на некоторых аспектах биологической значимости фосфолипидов. Говоря о роли фосфолипидов в функционировании биологических мембран, следует отметить, что клеточные мембраны, включая плазматическую мембрану и внутренние мембраны эукариотических клеток, представляют собой ансамбли фосфолипидных и белковых молекул [15, 16]. Содержание других компонентов составляет менее 5% (рис. 1).

Основная функция мембранных фосфолипидов – структурная: смесь фосфолипидов должна быть способна образовывать стабильный бислой для функционирования

мембранных белков (к таким фосфолипидам относятся фосфатидилхолин, фосфатидилглицерин, сфингомиелин и ряд гликолипидов). В то же время в мембране присутствуют некоторые фосфолипиды, которые могут образовывать небислойные структуры (фосфатидилэтаноламин, кардиолипин, фосфатидная кислота и основной метаболит фосфолипидов – диацилглицерин). Образование таких сильно искривленных участков необходимо при контакте между мембранами (процесс слияния клеток) или при связывании определенных белков в мембране и обеспечивает существование мембраны в функционально активном состоянии.

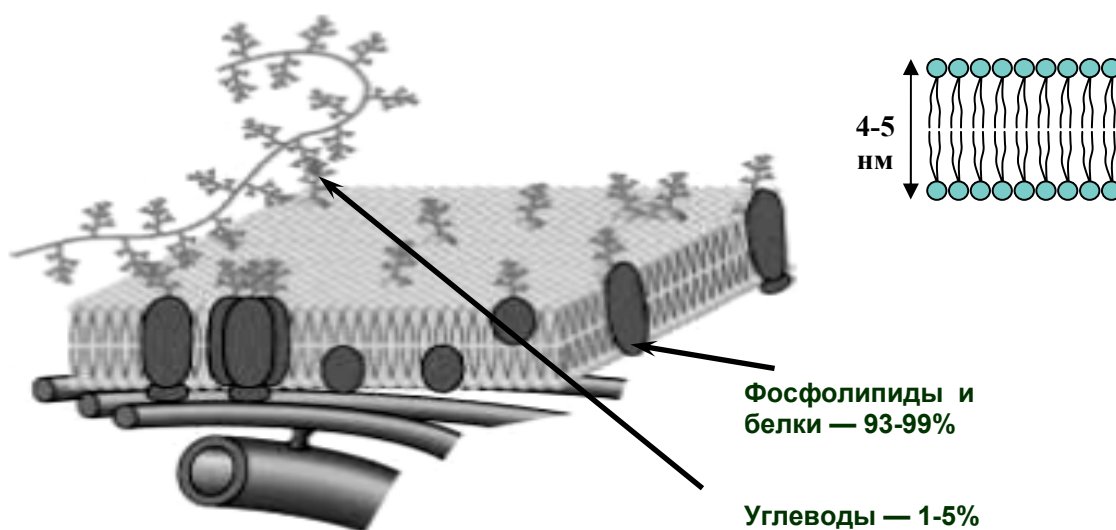


Рис. 1. Структура и основные компоненты биологических мембран.

Нами методами ЯМР на ядрах фосфора и дейтерия и электронной микроскопии изучено полиморфное поведение различных фосфолипидов, их смесей и основных

метаболитов (рис. 2) [17, 18]. Подтверждено, что данные структуры обеспечивают такие функции в мембране, как слияние, эндоцитоз, трансмембранный транспорт [17, 18].

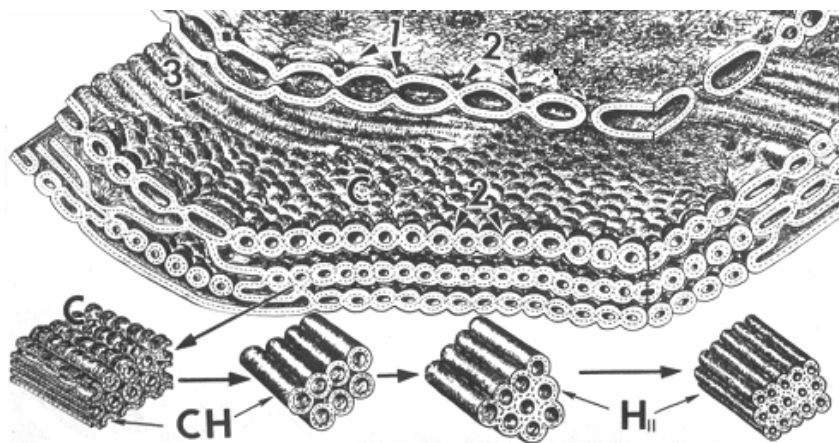


Рис. 2. Лиотропные фазовые переходы в водных дисперсиях фосфолипидов:

L – ламеллярная фаза, С – кубическая фаза, СН – промежуточные трубчатые структуры небольшой длины (переход из кубической в гексагональную фазу), H_{II} – гексагональная фаза, 1, 2, 3 – внутримембранные липидные частицы.

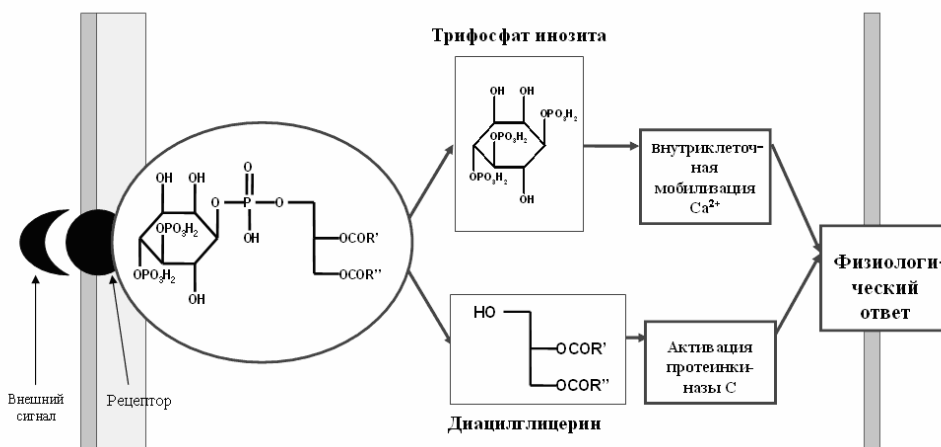
Фосфолипиды некоторых типов – важнейшие биорегуляторы. Примером служат фосфоинозитиды, которые, хотя и являются минорными компонентами фосфолипидных пулов, активно участвуют в важнейших метаболических процессах. Эти соединения участвуют в регуляции структуры мембран, связываются с лекарственными веществами и ферментами. Установлена роль фосфоинозитидов в первых актах стимуляции тромбоцитов, участие в гликогенезе после воздействия вазопрессина и других кальций-

мобилизующих агентов на гепатоциты, тесная связь метаболизма фосфоинозитидов с регуляцией начальной стадии пролиферации и др. [4].

Наиболее изучена регуляторная роль фосфоинозитидов и их метаболитов в плазматических мембранах эукариот. Некоторые мембранные фосфолипиды служат предшественниками вторичных посредников при передаче гормонального сигнала (схема 11) [4]. Так, фосфатидилинозит дифосфат под действием фосфолипазы С гидролизруется до

диацилглицерина – активатора протеинкиназы С и 1,4,5-трифосфата *мио*-инозита – регулятора кальциевого обмена в клетке. Диацилглицерин, 1,4,5-трифосфат *мио*-инозита, протеинкиназа С и Ca^{2+} – участники фосфоинозитидной системы передачи

сигнала, причем два первых соединения образуются из мембранных компонентов клетки, третий является мембраносвязанным белком и последний (Ca^{2+}) – ион, проникающий через специальные каналы на клеточной мембране.



R' и R'' — углеводородные цепи в высших жирных кислотах

Схема 11. Фосфоинозитидный цикл.

В качестве иллюстрации этих исследований на схеме 12 приводятся наши данные, посвященные фосфоинозитидному циклу [19]. Все исследования выполнены на основе приготовленных нами фосфоинозитидов. Так, методами ЯМР-спектроскопии было показано, что при активации фосфоинозитидного цикла, в ходе чего образуется диацилглицерин, происходит локальное и обратимое изменение структуры внутренней поверхности плазматической мембраны. Это приводит к увеличению связывания протеинкиназы С и ее активации, фосфорилированию белков, осу-

ществлению процесса передачи сигнала, что является основой клеточной регуляции. Исчезновение диацилглицерина сопровождается восстановлением исходной структуры мембраны.

Исследования строения и функциональной роли фосфоинозитидов охватывают широкий круг проблем биомедицинского характера – это механизмы возбуждения и проведения нервного импульса, секреции метаболитов, ферментов, гормонов; рецепция и сопряжение возбуждения рецептора с активацией эффекторных механизмов в клетке, пролиферация и многие другие [4].

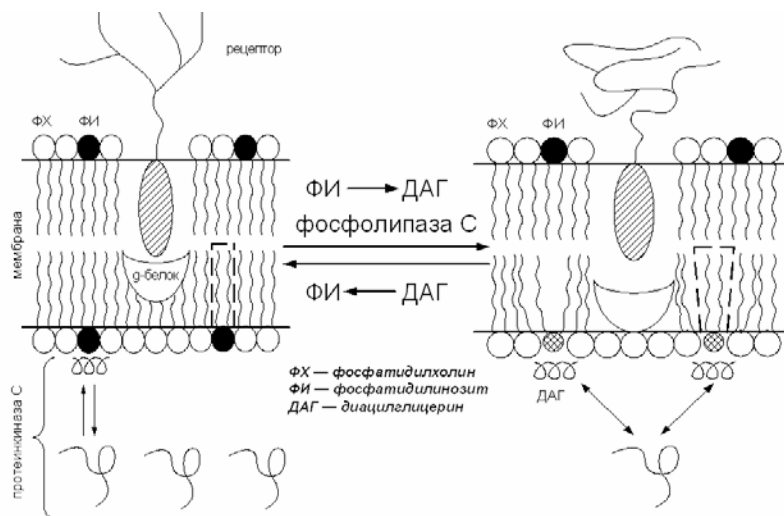


Схема 12. Метаболиты фосфоинозитидного цикла (диацилглицерины) локально изменяют структуру мембраны.

Некоторые углеводсодержащие фосфоинозитиды выполняют якорную функцию. Особый интерес представляют структурно-функциональные исследования строения и биологического действия этих соединений. Для фосфатидилинозитгликанов установлена ключевая роль в механизмах «заякоривания» ряда функциональных белков на поверхности плазматических мембран (схема 13) и в регуляции физиологического состояния клетки [20, 21].

Пример такого «заякоренного» белка – ацетилхолинэстераза, катализирующая гидролиз ацетилхолина в синаптической щели. Этот фермент фиксируется на постсинаптической

мембране, ковалентно присоединяясь к фосфатидилинозитгликану. При участии фосфолипазы C, гидролизующей мембранные фосфолипиды, может происходить модификация фосфолипидов и отделение белков от внешней поверхности клетки. Гликофосфоинозитиды являются предшественниками инозитгликановых структур, которым отводится важная роль в качестве вторичных посредников в механизмах действия инсулина в организме человека. Таким образом, системное изучение свойств гликофосфоинозитидов открывает перспективы их использования для создания лекарственных и диагностических препаратов [20, 21].

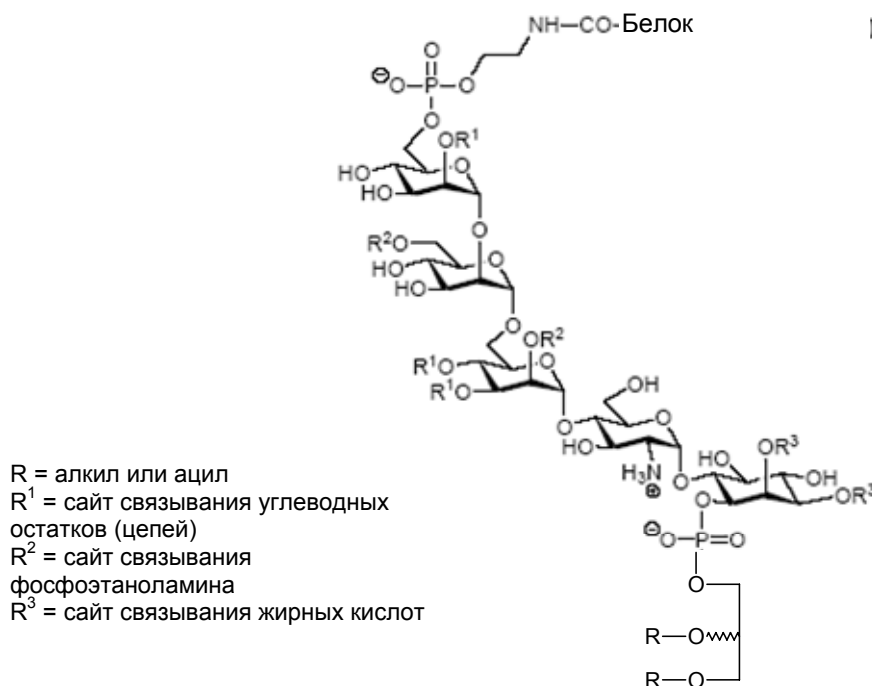


Схема 13. «Заякоривание» белков на поверхности плазматических мембран путем ковалентного связывания с фосфатидилинозитгликанами.

Фосфолипиды могут быть аллостерическими активаторами мембранных ферментов. Так, например, протеинкиназа C, которая катализирует фосфорилирование белков, в неактивной форме находится в цитозоле. Однако, после стимуляции клетки (повышения в клетке содержания ионов кальция) фермент активируется ионами кальция и оказывается связанным с мембраной (рис. 3). Функционально активная протеинкиназа C – комплекс, содержащий мономер фермента, молекулу диацилглицерина, один или более ионов кальция и четыре молекулы фосфатидилсерина [22–24].

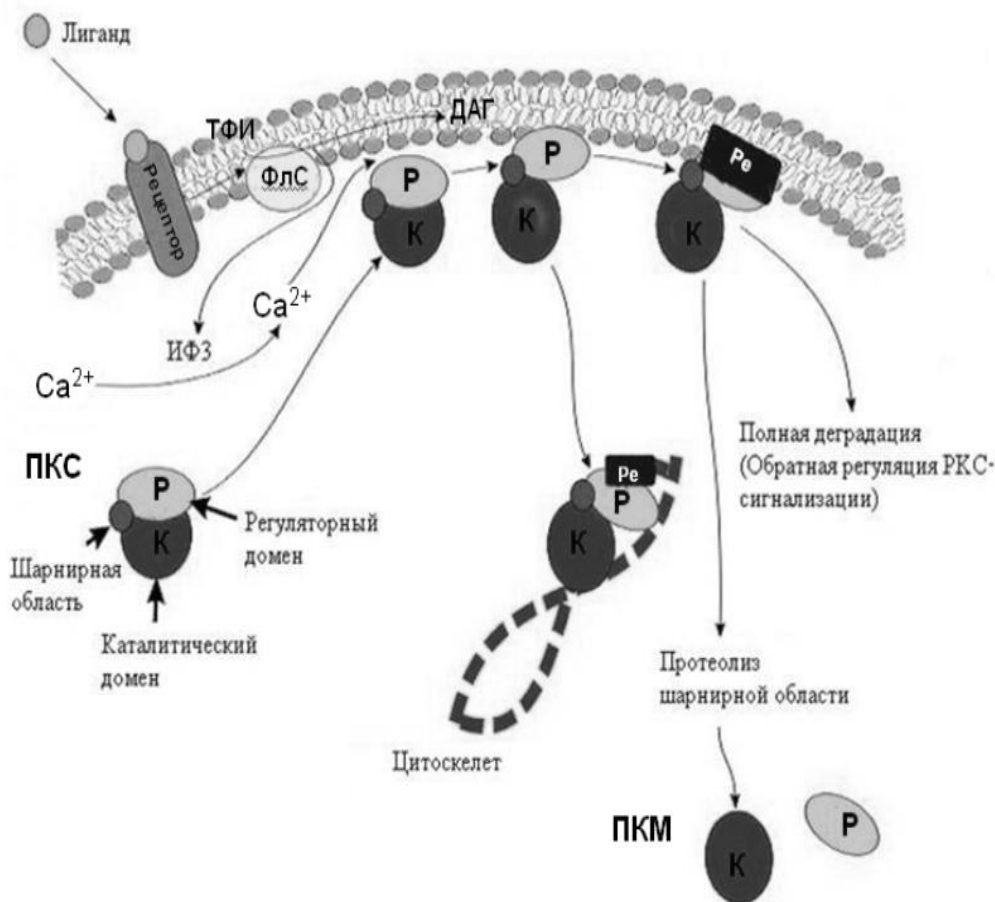
Одними из наиболее существенных являются иммунологические свойства фосфолипидов, такие как антигенность, иммуно-

генность и адьювантность.

Обнаружено, что фосфолипиды обладают антигенной активностью: фосфатидилинозит и маннофосфатидилинозит микобактерий, кардиолипин трепонем, фосфатидилглицерин гонококков, а также фосфолипиды микоплазм, коринобактерий, нокардий, листерий, стрептококков, сальмонелл и др. [2, 25]. Антитела к фосфолипидам встречаются у больных сифилисом, хроническими гепатитами C и B, при туберкулезе, лейшманиозе, лептоспирозе и других инфекциях. Обнаружены антитела к фосфатидилхолину, фосфатидилэтанолмину, фосфатидилсерину, фосфатидилглицерину, кардиолипину, фосфоинозитидам и др. фосфолипидам. Есть сведения об антителах к фосфолипидам у человека при

аутоиммунных заболеваниях. Речь идет об антифосфолипидном синдроме, действие которого направлено против основных компонентов клеточных мембран – фосфолипидов и, естественно, против собственных клеток и тканей организма, при этом фосфатидилсерин и кардиолипин наиболее антигенны. Антифосфолипидный синдром может сопровождаться нарушением мозгового кровообра-

щения с развитием инсульта, неврологической патологии, гипертонии и раннего атеросклероза. Особое внимание привлечено к противфосфолипидным антителам при антифосфолипидном синдроме у беременных, при котором аутоиммунные реакции оказывают влияние на процессы имплантации, роста, развития эмбриона и плода и исхода родов.



ПКС – протеинкиназа С
ТФИ – фосфатидилинозитидфосфат
ФЛС – фосфолипаза С
ДАГ – диацилглицерин
Рс – рецептор активированной протеинкиназы С
ПКМ – протеинкиназа М

Рис. 3. Протеинкиназа С в процессах регуляции клеточной активности.

Адьювантное действие фосфолипидов по отношению к различным антигенам установлено для антигенов вирусов, бактерий, белков крови, ферментов. Использование фосфолипидов позволяет придать высокую иммуногенность антигенам. Фосфолипидные адьюванты используются при производстве и разработке вакцин против гриппа, дифтерии, столбняка, гепатитов А и В [2, 25]. Некоторые аналоги лизофосфатидилхолина оказались мощными стимуляторами гуморального и

клеточного иммунитета.

В качестве примеров прикладного использования фундаментальных данных о биологической роли фосфолипидов приведем сведения о создании и внедрении с нашим участием следующих фосфолипидных препаратов. Это фосфолипидные антигены для диагностики туберкулеза, лейкоплазмозов и венерических заболеваний, фосфолипидные эмульгаторы для приготовления кровезаменителей, парентерального питания, фосфо-

липидные адъюванты для приготовления противоллипидных антирабических и противозэритроцитарных антисывороток [2, 26].

Наиболее широкое практическое применение нашел кардиолипиновый антиген, состоящий из кардиолипина, фосфатидилхолина и холестерина [27–29]. Он применяется при массовой серодиагностике сифилиса. Были установлены свойства веществ, входящих в состав антигена и определяющих его качество; показано, что факторы, дестаби-

лизирующие фосфолипидный бислой, приводят к ложноположительным, либо к ложноотрицательным результатам.

Один из наиболее перспективных биотехнологических приемов реализации свойств фосфолипидов – создание структур нанодиапазона – липосом, искусственных аналогов биологических мембран, и их загрузка классическими лекарствами [3, 30–33]. Строение нагруженной липосомы изображено на рис. 4, а различные типы липосом – на рис. 5.

Липосомы – замкнутые фосфолипидные бислойные структуры, имеющие водное содержимое.

Способы включения различных веществ в липосомы

- Включение во внутренний водный объем (водорастворимые вещества)
- Включение в гидрофобную область бислоя
- Адсорбция на поверхности
- Химическое связывание с компонентами бислоя

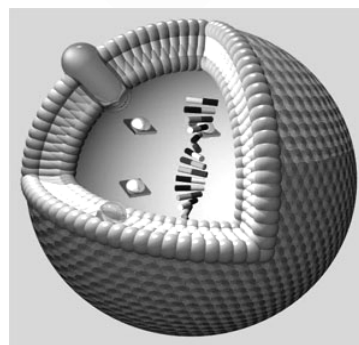
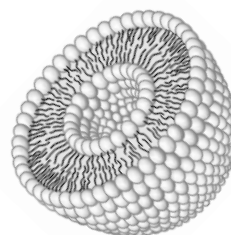
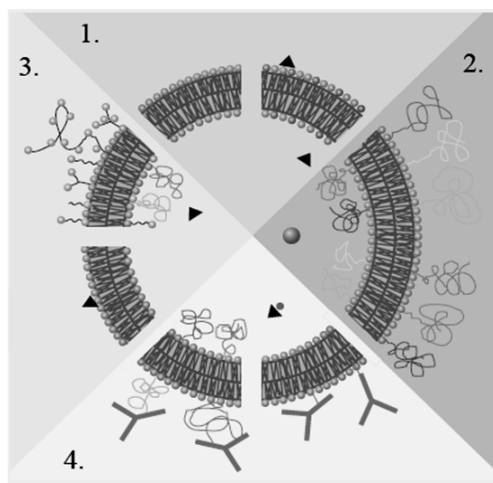


Рис. 4. Классическая липосома.



1. Традиционные липосомы
2. Пространственно стабилизированные липосомы
3. Катионные липосомы
4. Иммунолипосомы для направленного транспорта

Рис. 5. Типы липосом.

Создание липосомальных систем является перспективным направлением фармацевтической технологии [34]. Применение липосом в качестве носителей лекарственных веществ позволяет повысить селективность их действия и снизить токсичность. Использование липосом актуально при лечении злокачественных образований и внутриклеточных

инфекций, когда оптимизация биораспределения сильнодействующих препаратов является решающим фактором для повышения их результативности и улучшения качества жизни пациента [3, 30–33].

Показано, что эффективность использования липосом определяется их способностью оптимизировать фармакокинетику и

биораспределение лекарственных препаратов [3, 30–33]. Возможность контролируемого применения лекарственных веществ предопределяет перспективность липосомальных препаратов.

Важным преимуществом использования липосом является гибкость технологий их создания, позволяющая варьировать свойства носителей лекарственных препаратов в зависимости от характера и локализации

очага патологии [34]. На рис.6 иллюстрируется изменение фармакокинетики при использовании липосомальных лекарственных препаратов по сравнению с классическими лекарственными формами.

В табл. 2 приведены данные о преимуществах липосомальных препаратов по сравнению с традиционной лекарственной формой (растворами препаратов) за счет «пассивного нацеливания» [32, 33].

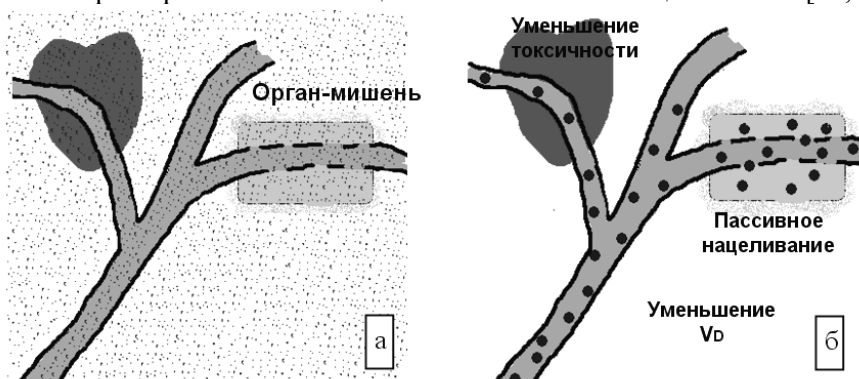


Рис. 6. Изменение фармакокинетики при использовании наноконтейнеров (липосом)
 а – *обычная форма*: равномерное распределение; высокая токсичность; малая концентрация в органе-мишени; быстрое выведение; преждевременная биотрансформация.
 б – *липосомная форма*: увеличение концентрации в крови; уменьшение токсичности; пассивное нацеливание в опухоль; пролонгирование действия; защита от биотрансформации.

Таблица 2. Преимущества липосомальных препаратов за счет «пассивного нацеливания».

Эффект	Активная субстанция	Липосомальный препарат / раствор препарата (относительные величины)
Время выживания животных	Доксорубицин	2 / 1
Накопление в сердце	Доксорубицин	1 / 2
Накопление в опухоли	Доксорубицин	8.5 / 1
LD ₅₀	Доксорубицин	2.3 / 1
Концентрация в плазме	Рифампицин, дауномицин	3.3-185* / 1
Равноэффективная доза	Дауномицин, ДОФА	1 / 10
Увеличение растворимости	Бетулиновая кислота	1000 / 1

* измерялась на разных объектах.

В настоящее время на мировом рынке фармацевтической продукции присутствует 30 липосомальных препаратов, причем 5 из них реализованы с нашим участием [3, 32, 33]. Все они созданы в советское время и внедрены после распада СССР на Харьковском предприятии «Биолек». Они конкурентны с зарубежными образцами, но, к сожалению, представлены только на украинском, а не на российском рынке. Это одно из отрицательных следствий распада СССР. В России производится единственный липо-

сомальный препарат «Фосфоглив» – липосомы из соевого фосфатидилхолина, нагруженные глицеризиновой кислотой. Это эффективный гепатопротекторный препарат, внедренный коллективом под руководством академика РАМН А.И. Арчакова [35].

Основные виды продаваемых липосомальных препаратов представлены далее [3].

Это противоопухолевые препараты – липосомальные формы доксорубицина и дауномицина. Интересен препарат Doxil – для

увеличения времени циркуляции в крови используют липосомы с привитыми полиэтиленгликолевыми цепями, так называемые стелз-липосомы.

Известны препараты для лечения грибковых и бактериальных инфекций. Некоторые патогенные бактерии, хотя и поглощаются макрофагами, но не полностью уничтожаются, например, при лейшманиозах, туберкулезе. Так как макрофаги служат естественными мишенями для липосом, то загруженные в липосомы антибиотики доставляются непосредственно к месту действия, значительно увеличивая эффективность их воздействия.

Так как макрофаги – это антиген-представляющие клетки, то доставка в них антигенов позволяет увеличить эффективность вакцинации. Известны следующие продажные вакцины на основе липосом: против гепатита А; поливалентная противогриппозная вакцина, действующая против трех штаммов вируса; вакцина против кишечных инфекций.

Кафедра биотехнологии и бионанотехнологии обладает опытом создания липосомальных препаратов, часть из которых внедрена в производство и представлена на рынке, другие находятся на разных стадиях продвижения и использования в практической медицине (табл. 3) [32, 33]. Предложены промышленные способы, позволившие создать апиrogenные и стерильные препараты, которые стабильны в течение двух лет. Так, был сконструирован и внедрен первый отечественный липосомальный противоопухолевый препарат «Липодокс» – липосомальный доксорубин [36], а также липосомальные препараты антигипоксического и гепатопротекторного действия – «Липин» и «Лиолив» и препараты типа «Липофлавон» для лечения кардиологических и офтальмологических заболеваний. На разных стадиях находятся другие разработки – противоопухолевые препараты на основе цисплатина, фторурацила, доцетаксела, бетулиновой кислоты, комплекса доксорубина и ангиостатина.

Таблица 3. Липосомальные лекарственные препараты, внедренные или разрабатываемые с участием коллектива кафедры Биотехнологии и нанобиотехнологии.

№	Препарат, активное вещество	Тип действия	Стадия исследования
1	Липодокс*, доксорубин	Противоопухолевый	Препарат производится
2	Липин*, фосфатидилхолин (ФХ)	Антигипоксический и др.	Препарат производится
3	Лиолив*, антраль	Гепатопротекторный	Препарат производится
4	Липофлавон*, кверцетин	Кардиологический	Препарат производится
5	Липофлавон*, капли	Офтальмологический	Препарат производится
6	Липоплан*, цисплатин	Противоопухолевый	Клинические испытания
7	Фторурацил*	Противоопухолевый	Клинические испытания
8	Липодоцетаксел*, доцетаксел	Противоопухолевый	Клинические испытания
9	Бетусом, бетулиновая кислота	Антимеланомный	Биологические испытания
10	Доксорубин* ⁴ + ангиостатин	Противоопухолевый	Лабораторные исследования
11	Аналог эссенциале*, ФХ	Гепатопротекторный	Доклинические испытания
12	Аминофосфатид*, цереброзидсульфат	При гемолитической болезни новорожденных	Закончены биологические испытания
13	Баларпан-Л* ² , глюкозамингликан	Ранозаживляющий	Клинические испытания
14	Липодофамин* ³ , дофамин	Антипаркинсонический	Биологические испытания
15	Рифампицин* ⁵	Противотуберкулезный	Биологические испытания
16	Изониазид* ⁵	Противотуберкулезный	Биологические испытания
17	Рифабутин* ⁵	Противотуберкулезный	Биологические испытания

* В сотрудничестве с предприятием «Биолек», Харьков.

*² В сотрудничестве с МНТК «Микрохирургия глаза»

*³ В сотрудничестве с Институтом общей патологии и патофизиологии РАМН

*⁴ В сотрудничестве с Всероссийским научным центром диагностики и лечения

*⁵ В сотрудничестве с НИИ туберкулеза РАМН.

Разрабатываются методы создания противотуберкулезных препаратов на основе рифампицина, рифабутина, изониазида, проводятся работы с препаратами для лечения болезни Паркинсона – липосомальный дофамин, для использования в офтальмологии – липосомальный баларпан.

Следует упомянуть «Аминофосфатид» – дисперсию, состоящую из сульфоллипидов спинного мозга крупного рогатого скота. Было обнаружено, что эти липосомы предотвращают комплемент-зависимый гемолиз [32, 33]. Дальнейшие исследования на модельных системах показали, что фармакофором является гидрофобный скелет с двумя

отрицательными зарядами на расстоянии приблизительно 1.4 нм. Совместно с Лабораторией протеолитических ферментов Института биоорганической химии РАН с помощью молекулярного докинга был локализован сайт связывания дизаряженных субстанций на C1q-компоненте комплемента [37, 38].

Преимущества липосомальных форм перед обычными препаратами проиллюстрированы следующими примерами [32, 33]. На рис. 7 можно видеть, как увеличивается выживаемость животных с привитой карциномой человека при лечении препаратом «Липодокс».

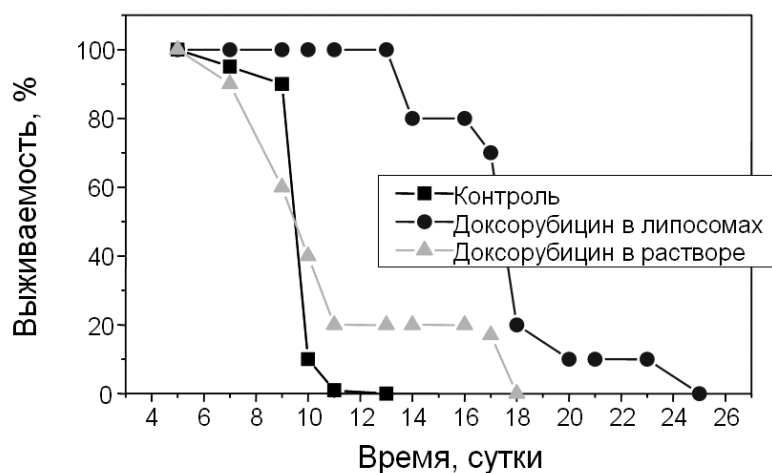


Рис. 7. Выживаемость мышей с карциномой при введении препаратов доксорубина.

Рис. 8 демонстрирует практически полное восстановление до нормы (1-ый столбец) уровня дофамина в стриатуме у мышей с экспериментальным синдромом Паркинсона

при введении липосомального дофамина (4-ый столбец). Обычный раствор препарата не приводит к терапевтическому эффекту (3-ий столбец) [32, 33].

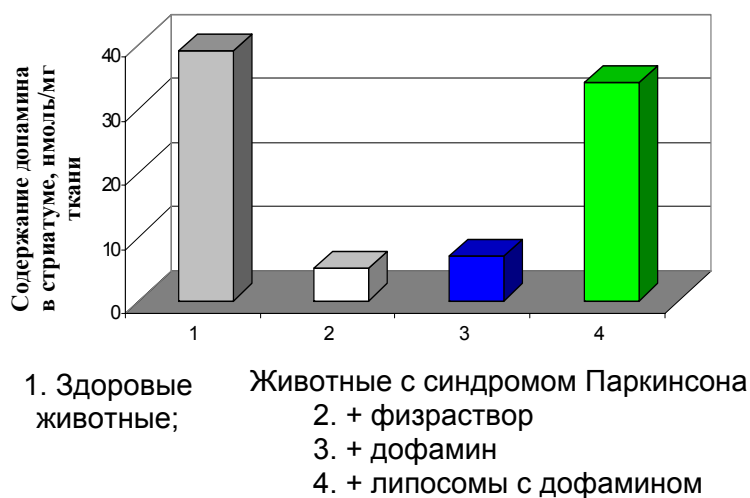


Рис. 8. Влияние липосом с дофамином на уровень его содержания в стриатуме мышей с синдромом Паркинсона.

Но в этой области существуют и проблемы, связанные с разработкой и применением липосомальных препаратов (табл. 4). Однако, уже находятся подходы к

их решению. Эти подходы позволяют реализовывать направления к созданию липосомальных препаратов высочайшей эффективности (табл. 5) [32, 33].

Таблица 4. Проблемы при создании липосомальных лекарственных препаратов и подходы к их решению.

Проблема	Подход к решению
Агрегация липосом, выход вещества из липосом	Введение насыщенных фосфолипидов, холестерина при формировании липосом; лиофилизация
Обеспечение стерильности препаратов	Стерилизующая фильтрация; производство препаратов по стандартам GMP
Ограниченное время циркуляции	Стерически стабилизированные липосомы

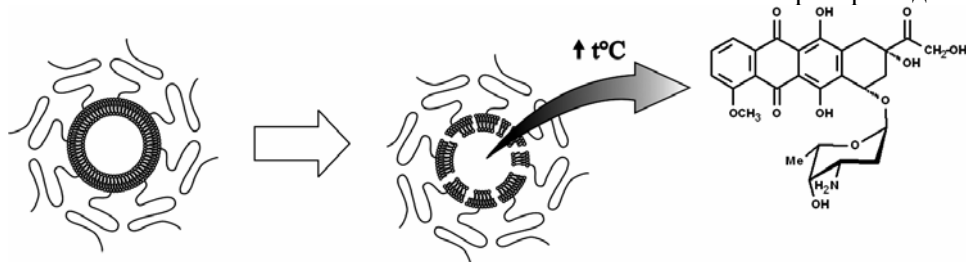
Таблица 5. Перспективы развития исследований и применения липосомальных препаратов.

Перспективы	Методология
Активное нацеливание	Иммобилизация «молекулярного адреса» на поверхности липосом
Липосомальные векторы для генной терапии	Моделирование структуры вирусов
Липосомы с контролируемым высвобождением	pH-чувствительные липосомы

Как уже отмечалось, ранее была создана и внедрена разработка производства препарата «Липодокса», которому присущи все недостатки, характерные для дисперсий немодифицированных липосом [32, 33]. Нами, совместно с сотрудниками Российского онкологического центра РАМН, руководимыми проф. А.Ю.Барышниковым, были оптимизированы условия для получения стерически стабилизированных термочувствитель-

ных липосом, загруженных доксорубицином (табл. 6). Особое внимание было уделено простоте метода, который позволял бы нарабатывать липосомальный препарат в количествах, необходимых для доклинических, клинических испытаний, а в перспективе и для терапии (схема 14). Такого типа липосомы обладают свойствами контролируемого высвобождения лекарственного средства при температуре выше физиологической.

Таблица 6. Основные характеристики полученного липосомального препарата доксорубина.



Липидный состав	DPPC : DSPC : DSPE-PEG-2000 : Chol * (9 : 1 : 0.02 : 0.2)
Размер липосом	230-250 нм
Размер липосом после регидратации лиофилизированного препарата	240-270 нм
Концентрация доксорубина	0.4 мг/мл
Степень включения доксорубина	85-92%
Степень включения доксорубина после регидратации лиофилизированного препарата	Не менее 80%
Соотношение субстанция/липид	0.2

* DPPC – дипальмитоилфосфатидилхолин
 DSPC – дистеароилфосфатидилхолин
 PEG – полиэтиленгликоль
 Chol – холестерин

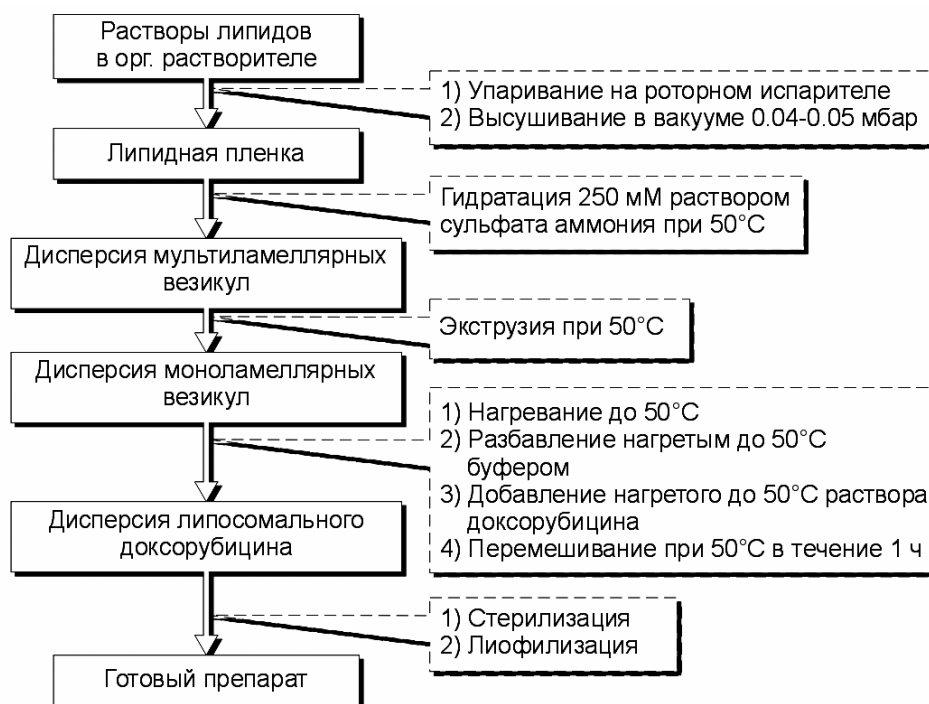


Схема 14. Оптимизация метода получения в полупромышленных масштабах стерически стабилизированных термочувствительных активно нагруженных доксорубином липосом.

На рис. 9 приведены данные, иллюстрирующие увеличение эффективности этого препарата по сравнению с обычным липосомальным доксорубином [32, 33].

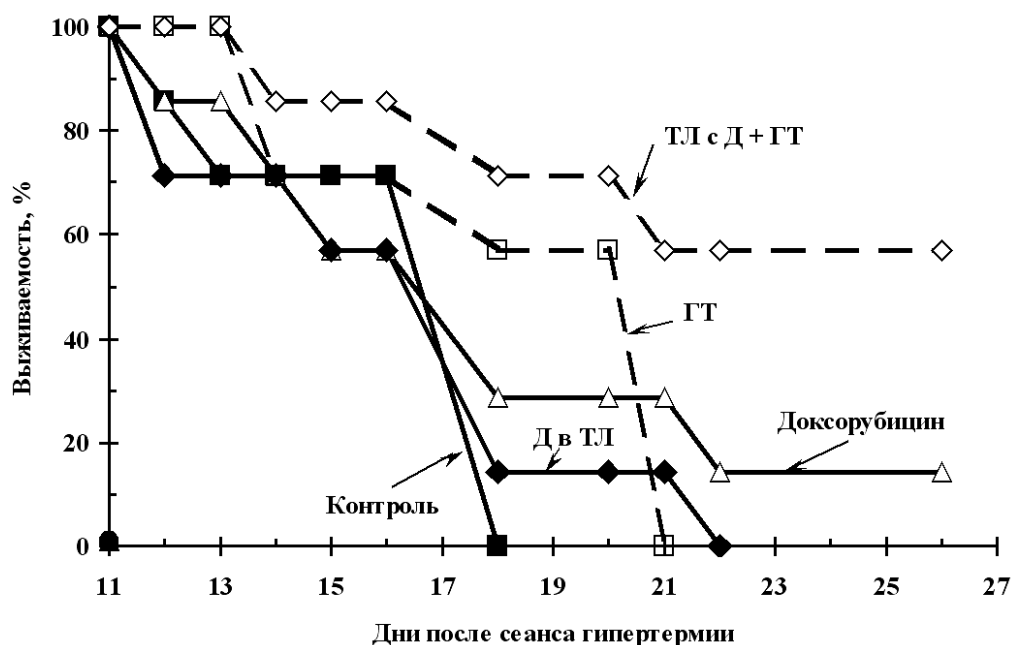


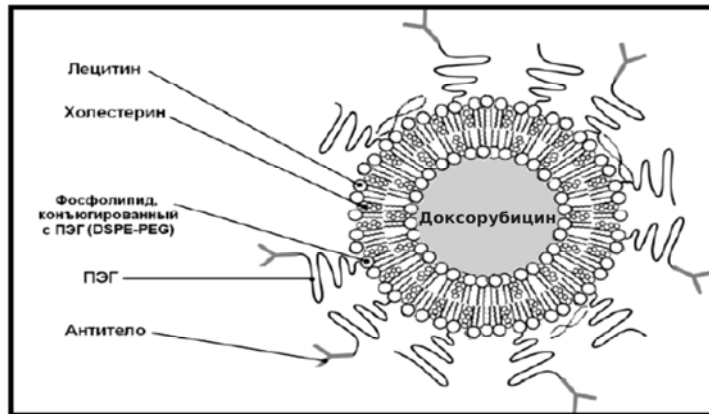
Рис. 9. Динамика гибели мышей с меланомой В-16 после локальной гипертермии (43°C, 30 мин) на фоне внутривенного введения термочувствительных липосом с доксорубином (Д).

Доза вводимого доксорубина во всех вариантах опыта составляла 4 мг/кг.
ТЛ – термочувствительные липосомы. ГТ – гипертермия. Контроль – физраствор.

Считается, что эффективность липосомальных препаратов может существенно увеличиться, если их нацеливать на клетки-мишени, присоединяя к ним «молекулярный

адрес» – молекулы, специфически связывающиеся с клетками-мишенями.

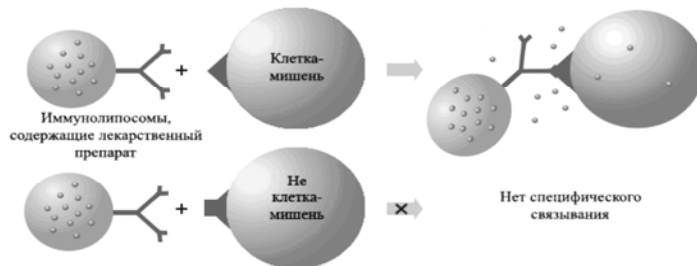
Реализация этой идеи представлена на рис. 10.



**Диаметр
иммунолипосом
 100 ± 12 нм**

**ПЭГ (PEG) —
полиэтиленгликоль**

**DSPE — дистеароил-
фосфатидилэтанола
мин**



**Принцип
направленной
доставки
лекарственного
препарата к клетке**

Рис. 10. Иммунолипосомы.

Так, коллективом, руководимым академиком РАМН В.П.Чехониным (в работе принимали участие аспиранты и студенты кафедры биотехнологии и бионанотехнологии), были сконструированы липосомы, загруженные доксорубицином против градиента сульфата аммония, на поверхности которых экспонированы цепи ПЭГ-2000 и антитела к глиофибрилярному кислому белку [32, 33, 39]. Данный «молекулярный адрес» выбран неслучайно. В качестве векторов для направленного транспорта лекарственных препаратов в очаги нарушения гематоэнцефалического барьера необходимо использовать нейроспецифические антитела (например, к основному белку миелина, глиофибрилярному белку, нейроспецифической енолазе и др.). Препарат ПЭГилированных иммунолипосом связывался с антигенами эмбриональных астроцитов мозга крысы. Проводятся работы по направленному иммунолипосомальному транспорту других антрациклиновых антибиотиков, интерлейкинов, ростовых факторов, генно-инженерных препаратов (плазмиды, ДНК-вакцины, антисмысловые нуклеотиды, малые интерферирующие РНК) [32, 33].

В настоящее время у нас имеется набор липосом, включающий термочувствительные,

стерически стабилизированные для увеличения времени циркуляции в крови, нацеливаемые с помощью «молекулярного адреса» в определенный очаг патологии, жесткие нетекущие и другие [32, 33].

На рис. 11 представлена конструкция на основе липосомы для направленной доставки генетического материала (основа генной терапии). Направленность доставки обеспечивает «молекулярный адрес», присоединенный к поверхности липосомальной частицы через гибкую полиэтиленгликолевую цепочку, при этом ее длина больше длины подобных «пустых» цепочек, также присоединенных к липосоме для увеличения времени циркуляции. В мембрану встроены молекулы белка слияния для облегчения входа терапевтического гена в цитозоль. ДНК для компактизации и компенсации отрицательного заряда вводится в комплексе с положительно заряженными фосфолипидами и полимерами. Легко видеть, что приведенная конструкция напоминает схему оболочки вируса — эффективной машины для введения чужеродной ДНК в клетку. Следует отметить, что такие работы по загрузке оболочек вируса лекарственными субстанциями в настоящее время уже развиваются, в частности, коллективом академика РАМН А.Л. Гинцбурга [32, 33, 40].

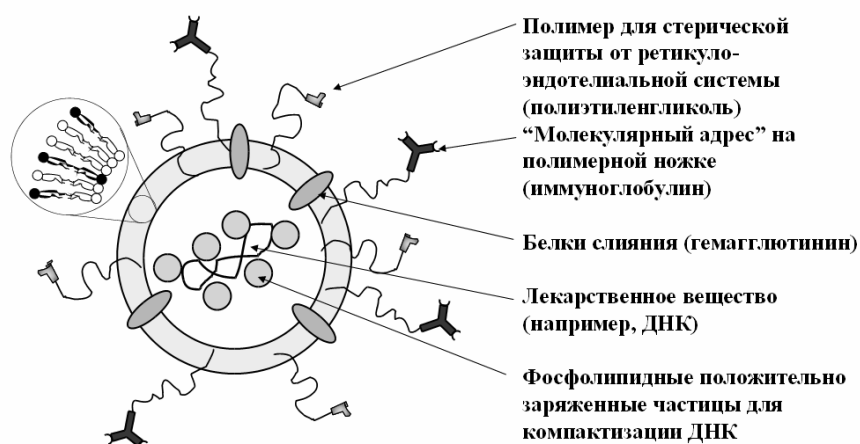


Рис. 11. Конструкция липосомы для направленной доставки лекарственного вещества в клетку.

Но следует понимать и недостатки липосомального транспорта. Необходимо иметь в виду определенную ограниченность их использования. Вот только основные ограничения: небольшая эффективность загрузки гидрофобных и большинства высокополярных субстанций (в том числе белков), «протекаемость» для многих веществ средней гидрофобности, химическая нестабильность фосфолипидов, агрегационная нестабильность липосомальных дисперсий, высокая цена.

Поэтому фосфолипидные наночастицы успешно дополняются другими наночастицами как лекарственными формами. Это – наноземульсии, твердые фосфолипидные наночастицы, кохлеаты, полимерные наносферы и т.д. Каждая из перечисленных нанодисперсий

имеет свои достоинства и недостатки. Но набор нескольких нанодисперсий может быть основой для выбора подходящей формы для каждой лекарственной субстанции.

Сфера применения бионанотехнологий в области фосфолипидов расширяется и уже сейчас может представлять интерес для практической медицины и бизнеса. И хотя проблемы в этой области еще далеки от их окончательного решения, уже сейчас очевидно, что это направление позволит в перспективе поднять на новый уровень разработки методов для диагностики и лечения тяжелых болезней человека. В заключение следует еще раз подчеркнуть, что биотехнологические исследования в области фосфолипидов являются основой этого направления.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Химия липидов / Р. П. Евстигнеева, Е. Н. Звонкова, Г. А. Серебренникова, В. И. Швеи. – М. : Химия, 1983. – 296 с.
2. Степанов, А. Е. Физиологически активные липиды / А. Е. Степанов, Ю. М. Краснопольский, В. И. Швеи. – М. : Наука, 1991. – 136 с.
3. Дудниченко, А. С. Липосомальные лекарственные препараты в эксперименте и клинике / А. С. Дудниченко, Ю. М. Краснопольский, В. И. Швеи. – Харьков : РА-Каравелла, 2001. – 144 с.
4. Мио-инозит и фосфоинозитиды / В. И. Швеи, А. Е. Степанов, В. Н. Крылова, П. В. Гулак // М. : Наука, 1987. – 248 с.
5. Resolution of asymmetrically substituted *myo*-inositols into optical antipodes / V. I. Shvets, B. A. Klyashchitskii, A. E. Stepanov, R. P. Evstigneeva // Tetrahedron. – 1973. – Vol. 29, № 6. – P. 331–345.
6. Stepanov, A. E. Formation of phosphoester bonds in phosphoglyceride synthesis / A. E. Stepanov, V. I. Shvets // Chem. Phys. Lipids. – 1986. – Vol. 41, № 1. – P. 1–51.
7. Shvets, V. I. Synthesis and complexation properties of inositol phosphates / V. I. Shvets. // In “Inositol Phosphates and Related Compounds: Synthesis and Therapeutic Potential”, Chapter 12, ed. A. B. Reitz. – ACS Symposium Series, 463, Washington, 1991. – P. 155–171.
8. Stepanov, A. E. Synthesis of inositol-containing glycopospholipids with natural and modified structure / A. E. Stepanov, V. I. Shvets // In: “Phosphoinositides. Chemistry, Biochemistry and Biomedical Applications”, ed. Karol S. Bruzik. – ACS Symposium Series, 718, Washington, 1999. – P. 244–254.

9. Zamyatina, A. Yu. The synthesis of 1-O-(2-N-stearoyl-*D*-erythrospinganine-1-phosphoryl)-2-O-(α -*D*-mannopyranosyl)-*D*-*myo*-inositol, a fragment of the naturally occurring inositol-containing glycerophosphosphingolipids / A. Yu. Zamyatina, V. I. Shvets // Chem. Phys. Lipids. – 1995. – Vol. 7, № 3. – P. 225–240.
10. Богомолов, О. В. Современные методы получения модифицированных глицерофосфолипидов / О. В. Богомолов, А. П. Каплун, В. И. Шве́ц // Успехи химии. – 1988. – Т. 57, № 4. – С. 684–710.
11. A general route to glycerophospholipids modified in the hydrophobic region (Friedel-Crafts reaction introducing arene modifiers into natural glycerophospholipids) / A. P. Kaplun, O. V. Bogomolov, N. B. Yakunina, Yu. V. Kuzmina, V. I. Shvets // Chem. Phys. Lipids. – 1998. – Vol. 94, № 3. – P. 193–208.
12. Каплун, А. П. Общий подход к ковалентной иммобилизации природных соединений / А. П. Каплун, Н. Б. Якунина, В. И. Шве́ц // Биоорг. химия. – 1992. – Т. 18, № 4. – С. 584–595.
13. Synthesis and intermembrane transfer of pyrene-labelled liponucleotides: ceramide phosphothymidines / O. V. Oskolkova, A. Hermetler, F. Paltauf, V. I. Shvets // Chem. Phys. Lipids. – 1999. – Vol. 99, № 1. – P. 73–86.
14. Проблемы и перспективы производства фосфолипидов / И. А. Василенко, Ю. М. Краснополяский, А. Е. Степанов, В. И. Шве́ц // Хим.-фарм. журнал. – 1998. – № 5. – С. 9–16.
15. Геннис, О. Б. Биомембраны. Молекулярная структура и функции / О. Б. Геннис. – М.: Мир, 1997. – 622 с.
16. Killian, J. A. “The double life” of membrane lipids / J. A. Killian, G. Van Meer // EMBO Rep. – 2001. – Vol. 21. – P. 91–95.
17. Сравнительная оценка методами ^{31}P -ЯМР и электронной микроскопии роли моноглицозидглицерида и фосфатидилэтаноламина в полиморфном поведении модельных мембран / Г. М. Сорокоумова, И. А. Василенко, Ю. С. Тараховский, В. Л. Боровягин, В. И. Шве́ц // Биол. мембраны. – 1985. – Т. 2, № 6. – С. 649–656.
18. Динамика перехода бислойная – гексагональная фаза в водных дисперсиях липидов / Г. М. Сорокоумова, И. А. Василенко, И. С. Якуб, В. И. Шве́ц // Биол. мембраны. – 1987. – Т. 4, № 10. – С. 1072–1083.
19. Проницаемость и слияние мембран, инициируемые продуктами метаболизма фосфоинозитидов / А. С. Шрагин, И. А. Василенко, А. А. Селищева, В. И. Шве́ц // ДАН СССР. – 1986. – Т. 287, № 3. – С. 717–720.
20. Kinoshita, T. Biosynthesis, remodeling and functions of mammalian GPI-anchored proteins: recent progress / T. Kinoshita, M. Fujita, Y. Maeda // J. Biochem. – 2008. – Vol. 144, № 3. – P. 287–294.
21. Brown, J. R. Glycan antagonists and inhibitors: a fount for drug discovery / J. R. Brown, B. E. Crawford, J. D. Esko // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. – 2007. – Vol. 42, № 6. – P. 481–515.
22. Dekker, L. V. Protein kinase C / L. V. Dekker. – New York: Springer, 2004. – 194 p.
23. Newton, A. C. Protein kinase C: structure, function and regulation / A. C. Newton // J. Biol. Chem. – 1995. – Vol. 270, № 48. – P. 28495–28498.
24. Гусев, Н. Б. Протеинкиназы: строение, классификация и биологическая роль / Н. Б. Гусев // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 12. – С. 4–12.
25. Краснополяский, Ю. М. Основные направления иммунохимии липидов / Ю. М. Краснополяский, В. И. Шве́ц // Украинский биохимический журнал. – 1984. – Т. 56, № 3. – С. 253–263.
26. Конструирование липидных диагностических препаратов / Ю. М. Краснополяский, И. И. Гольбец, Г. Л. Орлова, Г. А. Сенников, В. И. Шве́ц // Хим.-фарм. журнал. – 1983. – № 4. – С. 401–410.
27. Изучение оптимального состава кардиолипинового антигена для серодиагностики сифилиса / Г. А. Сенников, Л. С. Резникова, И. И. Гольбец, Г. Л. Орлова, Ю. М. Краснополяский, В. И. Шве́ц // Вестник дерматологии и венерологии. – 1978. – № 7. – С. 48–52.
28. Взаимосвязь структуры и свойств кардиолипинового антигена / И. А. Василенко, В. В. Чупин, Ю. М. Краснополяский, И. И. Гольбец, Г. А. Сенников, Р. П. Евстигнеева, В. И. Шве́ц // Хим.-фарм. журнал. – 1981. – № 2. – С. 14–18.
29. Влияние жирнокислотного состава и степени окисления липидов на иммунохимическую активность кардиолипинового антигена / Ю. М. Краснополяский, И. И. Гольбец, Г. Л. Орлова, Г. А. Сенников, В. И. Шве́ц // Вестник фармакологии и венерологии. – 1986. – № 8. – С. 51–56.

30. Липосомы и другие наночастицы как средство доставки лекарственных веществ / А. П. Каплун, Ле Банг Шон, Ю. М. Краснопольский, В. И. Швец // Вопросы мед. химии. – 1999. – Т. 45, № 1. – С. 3–12.
31. Каплун, А. П. Нанолечения – лекарства 21 века / А. П. Каплун // Жизнь без опасности. Здоровье. Профилактика. Долголетие. – 2007. – № 3. – С. 18–21.
32. Швец, В. И. Наноструктуры – перспективные лекарственные формы / В. И. Швец // Сб. материалов XIX (82) сессии Общего собрания Российской Академии Медицинских Наук. – М. : Медицина, 2008. – С.159–179.
33. От липосом семидесятых к нанобиотехнологии 21 века / В. И. Швец, А. П. Каплун, Ю. М. Краснопольский, А. Е. Степанов, В. П. Чехонин // Российские нанотехнологии. – 2008. – Т. 3, № 11-12. – С. 52–67.
34. Краснопольский, Ю. М. Некоторые аспекты технологии получения липосомальных форм лекарственных препаратов / Ю. М. Краснопольский, А. Е. Степанов, В. И. Швец // Хим.-фарм. журнал. – 1999. – № 10. – С. 20–23.
35. Ипатова, О. М. Фосфоглив – механизм действия и применение в клинике / О. М. Ипатова. – М. : изд-во ГУ НИИ биомедицинской химии РАМН, 2005. – 318 с.
36. Разработка технологии производства препарата липодокс – липосомной формы доксорубина / Д. Д. Победимский, А. Е. Степанов, А. П. Каплун, Ю. М. Краснопольский, А. С. Дудниченко, Д. Г. Победимский, В. И. Швец // Химия и рынок. – 2004. – № 3. – С.13–22.
37. Inhibition of classical pathway of complement activation with negative charged derivatives of bisphenol and bisphenol disulfates / S. V. Bureeva, J. E. Andia-Pravdivy, G. N. Petrov, M. A. Igumnov, S. V. Romanov, E. A. Kolesnikova, A. P. Kaplun, L. V. Kozlov // J. Bioorg. Med. Chem. – 2005. – Vol. 13, № 4. – P. 1045–1052.
38. Selective inhibition of the interaction of C1q with immunoglobulins and the classical pathway of complement activation by steroids and triterpenoids sulfates / S. Bureeva, J. Andia-Pravdivy, A. Symon, A. Bichucher, V. Moskaleva, V. Popenko, A. Shpak, V. Shvets, L. Kozlov, A. Kaplun // Bioorg. & Med. Chem. – 2007. – Vol. 15, № 3. – P. 3489–3498.
39. ПЭГилированные иммунолипосомы, специфичные к шванновским клеткам нервной ткани / В. П. Чехонин, О. И. Гурина, О. В. Лохонина, А. Е. Рябинина, М. А. Максимова, А. В. Семенова, В. И. Швец // ДАН. – 2007. – Т. 417, № 4. – С. 1–3.
40. Народицкий, Б. С. Использование нановирусных частиц в медицине / Б. С. Народицкий, М. М. Шмаров, Д. Ю. Логунов // Сб. материалов XIX (82) сессии Общего собрания Российской Академии Медицинских Наук. – М. : Медицина, 2008. – С.180–188.