



Липосомы – метаболически активные транспортные системы лекарственных средств: визуализация и фармакокинетика. Часть 2 (обзор)

О. Н. Пожарицкая¹, Ю. М. Коцур²✉, С. С. Осочук³, Е. В. Флисюк², И. Е. Смехова²,
С. Д. Малков², К. О. Зарифи², И. А. Титович², Е. К. Красова², А. Н. Шиков²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Мурманский морской биологический институт Российской академии наук (ММБИ РАН). 183038, Россия, г. Мурманск, ул. Владимирская, д. 17

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, литера А

³ Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет». 210009, Республика Беларусь, г. Витебск, пр-т Фрунзе, д. 27

✉ Контактное лицо: Коцур Юлия Михайловна. E-mail: uliya.kocur@spcru.ru

ORCID: О. Н. Пожарицкая – <https://orcid.org/0000-0003-1061-0665>;

Ю. М. Коцур – <https://orcid.org/0000-0001-9292-4240>;

С. С. Осочук – <https://orcid.org/0000-0003-2074-3832>;

Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>;

И. Е. Смехова – <https://orcid.org/0000-0002-0013-4784>;

С. Д. Малков – <https://orcid.org/0009-0002-5678-672X>;

К. О. Зарифи – <https://orcid.org/0009-0001-1190-5839>;

И. А. Титович – <https://orcid.org/0000-0002-1343-4663>;

Е. К. Красова – <https://orcid.org/0000-0001-7785-4256>;

А. Н. Шиков – <https://orcid.org/0000-0003-4351-0695>.

Статья поступила: 29.08.2024

Статья принята в печать: 15.11.2024

Статья опубликована: 15.11.2024

Резюме

Введение. Во второй части обзора рассмотрены вопросы визуализации, фармакокинетики и биораспределения липосом.

Текст. Существует широкий спектр методов визуализации, доступных для оценки морфологии липосом и их качества, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки: световая микроскопия, ESEM, TEM, AFM и пр. В целом выбор метода зависит от того, какие морфологические характеристики и степень детализации требуются. В процессе подготовки проб липосом важно понимать особенности образцов и метода визуализации. Адекватно проведенные исследования по фармакокинетике и биораспределению также могут расцениваться как инструмент визуализации липосом. Фармакокинетика липосомальных форм определяется множеством факторов, таких как природа ЛС, дозировка, липидный состав, размер липосом, заряд, покрытие липосом вспомогательными веществами и способ введения. Кроме того, взаимодействие липосомальных форм с иммунной системой, ретикулоэндотелиальной системой и компонентами крови играет важную роль в их абсорбции, распределении и выведении из организма.

Заключение. Лучшее понимание абсорбции, биораспределения, метаболизма и выведения липосомальных форм необходимо для разработки современных лекарственных средств.

Ключевые слова: липосомы, визуализация, фармакокинетика, мРНК

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. С. Д. Малков и К. О. Зарифи проводили сбор и систематизацию материала, работали с табличным материалом, участвовали в написании текста. Ю. М. Коцур осуществляла сбор данных из литературных источников, проводила сбор и анализ полученных данных, отвечала за написание. С. С. Осочук, О. Н. Пожарицкая, Е. В. Флисюк, И. Е. Смехова и А. Н. Шиков отвечали за концепцию обзора, редактирование текста статьи, научное консультирование и утверждение окончательного варианта статьи для публикации. Е. К. Красова и И. А. Титович осуществляли редактирование и оформление текста статьи.

© Пожарицкая О. Н., Коцур Ю. М., Осочук С. С., Флисюк Е. В., Смехова И. Е., Малков С. Д., Зарифи К. О., Титович И. А., Красова Е. К., Шиков А. Н., 2024

© Pozharitskaya O. N., Kozur Yu. M., Osouchuk S. S., Flisyuk E. V., Smekhova I. E., Malkov S. D., Zarifi K. O., Titovich I. A., Krasova E. K., Shikov A. N., 2024

Финансирование. Результаты работы получены в рамках выполнения государственного задания по теме «Разработка композиции и технологии получения нового липидного наноносителя с применением ионизируемых липидов для адресной доставки мРНК-вакцин, направленных на здоровьесбережение и повышение качества жизни населения», зарегистрированного в ЕГИСУ НИОКТР научным направлением ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России № 124041800053-8 от 18 апреля 2024 года.

Для цитирования: Пожарицкая О. Н., Коцур Ю. М., Осочук С. С., Флисюк Е. В., Смехова И. Е., Малков С. Д., Зарифи К. О., Титович И. А., Красова Е. К., Шиков А. Н. Липосомы – метаболически активные транспортные системы лекарственных средств: визуализация и фармакокинетика. Часть 2. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):78–98. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1919>

Liposomes – metabolically active drug transport systems: visualization and pharmacokinetic. Part 2 (review)

Olga N. Pozharitskaya¹, Yuliya M. Kozur²✉, Sergey S. Osochuk³, Elena V. Flisyuk²,
Irina E. Smekhova², Sergey D. Malkov², Kseniya O. Zarifi², Irina A. Titovich²,
Elena K. Krasova², Alexander N. Shikov²

¹ Murmansk Marine Biological Institute of the Russian Academy of Sciences (MMBI RAS). 17, Vladimirskaia str., Murmansk, 183038, Russia

² Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

³ Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University. 27, Frunze avenue, Vitebsk, 210009, Republic of Belarus

✉ **Corresponding author:** Yuliya M. Kotsur. **E-mail:** uliya.kocur@spcpcu.ru

ORCID: Olga N. Pozharitskaya – <https://orcid.org/0000-0003-1061-0665>;

Yuliya M. Kozur – <https://orcid.org/0000-0001-9292-4240>;

Sergey S. Osochuk – <https://orcid.org/0000-0003-2074-3832>;

Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>;

Irina E. Smekhova – <https://orcid.org/0000-0002-0013-4784>;

Sergey D. Malkov – <https://orcid.org/0009-0002-5678-672X>;

Kseniya O. Zarifi – <https://orcid.org/0009-0001-1190-5839>;

Irina A. Titovich – <https://orcid.org/0000-0002-1343-4663>;

Elena K. Krasova – <https://orcid.org/0000-0001-7785-4256>;

Alexander N. Shikov – <https://orcid.org/0000-0003-4351-0695>.

Received: 29.08.2024

Accepted: 15.11.2024

Published: 15.11.2024

Abstract

Introduction. In the second part of the review we discussed aspects of visualization, pharmacokinetics and biodistribution of liposomes.

Text. Many different methods have been proposed for the visualization of liposomes morphology and quality such as light microscopy, ESEM, TEM, AFM, etc. Each method has its own advantages and limitations which are discussed in the article: In general, the selection of method depends on the specific morphological characteristics and level of details. It is important to understand the specificity of the liposomes and the visualization method for correct preparation of samples. Adequately performed pharmacokinetic and biodistribution studies can also be used as a tool for liposome visualization. The nature of active pharmaceutical ingredients, dose, lipid components, size of liposomes, charge, coating of liposomes with excipients and route of administration significantly affects the pharmacokinetics of liposomal forms. Additionally, the interaction of liposomal forms with the immune system, reticuloendothelial system and blood components play an important role in their absorption, distribution and elimination.

Conclusion. The better understanding of the absorption, biodistribution, metabolism and clearance of liposomal formulations is essential for the development of modern drugs.

Keywords: liposomes, visualization, pharmacokinetics, mRNA

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Sergey D. Malkov and Kseniya O. Zarifi collected and systematized the material, worked with tabular material, and participated in writing the text. Yuliya M. Kozur collected data from literary sources, collected and analyzed the data obtained, and was responsible for writing. Sergey S. Osochuk, Olga N. Pozharitskaya, Elena V. Flisyuk, Irina E. Smekhova and Alexander N. Shikov were responsible for the concept of the review, editing the text of the article, scientific consulting, and approval of the final version of the article for publication. Elena K. Krasova and Irina A. Titovich edited the text of the article and designed the text of the article.

Funding. The results of the work were obtained as part of the implementation of the State assignment on the topic "Development of the composition and technology of a new lipid nanocarrier using ionizable lipids for targeted delivery of an mRNA vaccine aimed at preserving health and improving the quality of life of the population", registered in the Unified state information system for recording research, development and technological work for civil purposes of the modern direction of the St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical University. № 124041800053-8 dated April 18, 2024.

For citation: Pozharitskaya O. N., Kozur Yu. M., Osochuk S. S., Flisyuk E. V., Smekhova I. E., Malkov S. D., Zarifi K. O., Titovich I. A., Krasova E. K., Shikov A. N. Liposomes – metabolically active drug transport systems: visualization and pharmacokinetic. Part 2. *Drug development & registration*. 2024;13(4):78–98. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1919>

ВВЕДЕНИЕ

Липосомы как коллоидная система доставки лекарств, появившаяся в 1960-х годах, остаются в центре внимания обширных исследований и являются высокоэффективным методом доставки лекарств. В первой части обзорной статьи мы обсудили современную классификацию липосом, методы их изготовления, стабилизации и роли составляющих компонентов [1]. Во второй части обзорной статьи мы сфокусировались на методах идентификации липосом и их фармакокинетики, включая системную абсорбцию при различных путях введения, биораспределение в организме и выведение.

ЛИПОСОМЫ: ПРОЩЕ СКАЗАТЬ, ЧЕМ ДОКАЗАТЬ

В большинстве публикаций авторы заявляют о получении липосом, но редко предоставляют доказательства того, что они сформированы и что действующие вещества включены в липосому, а не абсорбированы на ее поверхности. Поэтому важным аспектом физико-химической оценки липосом является визуализация морфологии наночастиц.

Одним из наиболее распространенных методов изучения размеров и морфологии липосомальных частиц является микроскопия (рисунок 1). Существующие методы такой визуализации можно разделить на световую, электронную и атомно-силовую микроскопию [2]. Каждый имеет свои преимущества и ограничения, которые следует учитывать при оценке систем доставки лекарственных субстанций (ЛС) в форме липосом (таблица 1).

Световая микроскопия

Для световой или оптической микроскопии используют микроскопы, в которых видимый свет и расположение линз увеличивают поле зрения. Базовая световая микроскопия сама по себе не дает исчерпывающей информации о липидном бислое по срав-

нению с другими методами микроскопии. Однако ее можно использовать для быстрого получения изображения везикул на базовом лабораторном оборудовании [2], общей информации о размере, форме, однородности и степени агрегации образцов липосом [3, 18]. Методом оптической микроскопии можно визуализировать и проводить микроманипуляции с отдельными везикулами GUV, часто используемыми из-за большого размера в качестве мембранных модельных систем [19].

Из-за небольшого предельного разрешения (~250 нм) световые микроскопы неспособны предоставить подробную информацию о структуре малых однослойных везикул (SUV) и их ламеллярности [2], позволяя получить значительную информацию лишь о гигантских однослойных везикулах (GUV), диаметр которых варьируется от одного до сотен микрометров [20]. Для получения большей информации о трехмерной структуре и ламеллярности везикул возможно включение флуоресцентных зондов, применение методов поляризации и конфокальной микроскопии высокого разрешения [20].

Поляризационная микроскопия

Этот тип световой микроскопии основан на способности поляризованного света взаимодействовать с поляризующимися связями упорядоченных молекул [21]. Повышенное поглощение света происходит, когда молекулярные диполи в образце выравниваются по вектору поляризации падающей световой волны, что приводит к разнице фаз между выборочными световыми лучами и, в свою очередь, к интерференционно-зависимым изменениям амплитуды в плоскости изображения [21]. Контраст изображения в этом случае возникает не только из-за эффектов интерференции и дифракции, но и из-за наличия упорядоченного расположения молекул [21]. Метод используется для изучения формы и динамики многих упорядоченных клеточных структур, включая липидные бислои плазматических мембран [2, 21], изображения получают как в монохромном, так и в цветном испол-

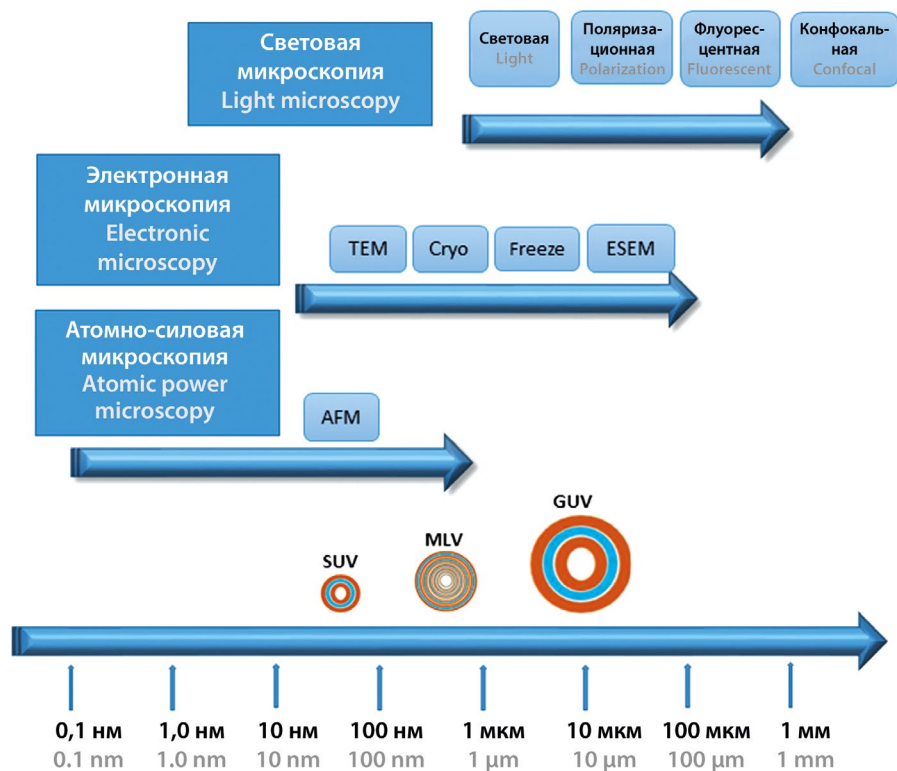


Рисунок 1. Микроскопические методы визуализации липосом
Figure 1. Microscopic techniques for visualizing liposomes

нении. Метод является альтернативным способом визуализации липосом, особенно для подтверждения образования везикул, однако он не дает убедительных данных относительно характеристик двухслойности или ламеллярности везикул [2] и не обеспечивает четких изображений частиц в нанометровом диапазоне: оптимальную прозрачность имеют крупные везикулы микрометрового диапазона, то есть поляризационная микроскопия также ограничена размером везикул, которые можно визуализировать.

Таблица 1. Современные методы визуализации липосом
Table 1. Current methods for visualizing liposomes

Метод микроскопии Microscopy method	Преимущества метода Advantages	Ограничения Limitations	Источник Reference
Световая (оптическая) Light (optical)	Быстрый и простой. Дает общую информацию о размере, форме, однородности и степени агрегации. Лучше всего подходит для GUVs Fast and simple. Gives general information about size, shape, uniformity and degree of aggregation. Best suited for GUVs	Не позволяет получить исчерпывающую информацию о липидном бислое, особенно для SUVs Does not provide comprehensive information about the lipid bilayer, especially for SUVs	[2, 3]
Поляризационная Polarization	Альтернативный метод подтверждения образования везикул. Оптимальная прозрачность для крупных везикул микронного диапазона An alternative method to confirm vesicle formation. Optimal transparency for large vesicles in the micron range	Не позволяет получить убедительные данные, подтверждающие бислоичность или пластинчатость везикул Does not provide convincing data confirming the bilayer or lamellar nature of vesicles	[2]

Продолжение таблицы 1

Метод микроскопии Microscopy method	Преимущества метода Advantages	Ограничения Limitations	Источник Reference
Флуоресцентная Fluorescent	Особенно подходит для визуализации GUVs для получения информации о форме, размере и текучести липидных везикул. Можно применять несколько зондов в образце для получения информации о структуре мембраны Particularly suitable for imaging GUVs to obtain information about the shape, size and fluidity of lipid vesicles. Multiple probes can be used in a sample to obtain information about membrane structure	Добавление зондов и красителей может влиять на свойства липидных везикул и/или вызывать появление экспериментальных артефактов, что может привести к неточной интерпретации данных. Фотоиндуцированное перекисное окисление липидов может привести к образованию доменов. Длительное воздействие флуоресцентного света может вызвать обесцвечивание и потерю интенсивности флуоресценции The addition of probes and dyes may affect the properties of lipid vesicles and/or introduce experimental artifacts, which may lead to inaccurate interpretation of the data. Photoinduced lipid peroxidation can lead to the formation of domains. Prolonged exposure to fluorescent light may cause discoloration and loss of fluorescent intensity	[2, 4, 5]
Конфокальная Confocal	Превосходная четкость изображения по сравнению с флуоресцентной микроскопией. Может предоставить составное 3D-изображение образца. Визуализация внутренней структуры липидных везикул, особенно GUVs Superior image clarity compared to fluorescence microscopy. Can provide a composite 3D image of the sample. Visualization of the internal structure of lipid vesicles, especially GUVs	Невозможность визуализации с высоким разрешением SUVs или олиголамеллярных липосом Inability to visualize SUVs or oligolamellar liposomes with high resolution	[2, 6, 7]
Сканирующая электронная (SEM) Scanning Electronic (SEM)	Визуализация мелких везикул при очень большом увеличении. Общая информация о размере и сферической морфологии липидных везикул Visualization of small vesicles at very high magnification. General information on the size and spherical morphology of lipid vesicles	Невозможность получения подробной информации о ламеллярности и внутренней структуре липидных везикул. Структура липосом может подвергаться изменениям из-за условий глубокого вакуума и окрашивания частиц перед визуализацией The inability to obtain detailed information about the lamellarity and internal structure of lipid vesicles. Liposome structure may be subject to changes due to high vacuum conditions and particle staining prior to imaging	[7, 8]

Продолжение таблицы 1

Метод микроскопии Microscopy method	Преимущества метода Advantages	Ограничения Limitations	Источник Reference
Просвечивающая (трансмиссионная) электронная микроскопия. Метод негативного окрашивания Transmission (transmission) electron microscopy. Negative staining method	Обеспечивает гораздо большее увеличение для визуализации везикул, в том числе SUVs. Предоставляет информацию о морфологии, распределении размеров, однородности и структуре поверхности Provides much higher magnification for visualization of vesicles, including SUVs. Provides information on morphology, size distribution, uniformity and surface structure	Везикулы находятся в непосредственном контакте с сеткой, что может повлиять на их ориентацию и морфологию. Помещение образца в вакуум может привести к дальнейшему обезвоживанию образца. Пробоподготовка может вызвать изменения исходной структуры липосом и привести к созданию светлых и темных полос, которые ошибочно можно принять за ламеллярные структуры Vesicles are in direct contact with the mesh, which can affect their orientation and morphology. Placing the sample in a vacuum may cause further dehydration of the sample. Sample preparation can cause changes in the initial structure of liposomes and lead to the creation of light and dark bands that can be mistaken for lamellar structures	[2, 7]
Криоэлектронная Cryoelectronic	Наиболее удобная и доступная форма микроскопии. Позволяет анализировать липосомы в их нативном состоянии. Нет проблем с химической фиксацией, обезвоживанием, разрезанием и окрашиванием. Предоставляет подробную информацию о размере, форме, внутренней структуре и пластинчатости липосом. Пробоподготовка сводится к минимуму образования кристаллов льда и сохранения белков или других материалов. Диапазон разрешения от ~5 до 500 нм в зависимости от толщины пленки The most convenient and accessible form of microscopy. Allows analysis of liposomes in their native state. There are no problems with chemical fixation, dehydration, cutting and dyeing. Provides detailed information about the size, shape, internal structure and lamellarity of liposomes. Sample preparation minimizes the formation of ice crystals and preservation of proteins or other materials. Resolution range from ~5 to 500 nm depending on film thickness	Используются меньшие дозы электронов, что может привести к более низкому разрешению по сравнению с другими методами ТЕМ. Артефакты возможны из-за образования тонкой пленки аморфного льда и использования блоттинга на образце, применяющего сдвиговые усилия во время формирования пленки Lower electron doses are used, which may result in lower resolution compared to other TEM techniques. Artifacts are possible due to the formation of a thin film of amorphous ice and the use of blotting on the sample, applying shear forces during film formation	[9, 10, 11]

Метод микроскопии Microscopy method	Преимущества метода Advantages	Ограничения Limitations	Источник Reference
Электронная микроскопия с замораживанием и разрушением Freeze-disruption electron microscopy	Обеспечивает большее увеличение наночастиц, в том числе SUVs. Нет процесса сушки. Подробная информация о трехмерной структуре везикул и двухслойной организации липосом. Реплики точно отражают исходное нативное состояние образца Provides a greater increase in nanoparticles, including SUVs. No drying process. Details of the three-dimensional structure of vesicles and bilayer organization of liposomes. Replicas accurately reflect the original native state of the sample	Во время подготовки в образце могут возникать артефакты из-за недостаточной скорости замораживания, повторного осаждения молекул растворителя и/или механического напряжения	[2, 12, 13]
Средовая сканирующая электронная (ESEM) Environmental Scanning Electronic (ESEM)	Визуализация мелких пузырьков при большом увеличении. Получение общей информации о размере и форме липосом. Отображение динамических изменений влажных систем без предварительной пробоподготовки. Не требуется использование фиксации, окрашивания или замораживания везикул. Возможность изменения среды пробы, включая давление, температуру и состав газа Visualization of small bubbles at high magnification. Obtaining general information about the size and shape of liposomes. Display dynamic changes in wet systems without prior sample preparation. No fixation, staining or freezing required vesicles. Ability to change sample environment, including pressure, temperature and gas composition	Невозможность получения подробной информации о внутренней структуре липидных везикул	[2, 7, 14]
Атомно-силовая Atomic power	Высокое разрешение. Обеспечение 3D-изображения липосом и подробной информации о морфологии, распределении размеров, однородности, стабильности и структуре поверхности. Не требует работы в вакууме, возможность работы в окружающем воздухе или под жидкостью. Получение информации о механических и химических свойствах поверхности образца посредством измерения силы High resolution. Providing 3D images of liposomes and detailed information on morphology, size distribution, uniformity, stability and surface structure. Does not require operation in a vacuum, the ability to work in ambient air or under liquid. Obtaining information about the mechanical and chemical properties of a sample surface through force measurements	Требуется адсорбция наночастиц на опорных поверхностях, что может изменить размер и форму везикул. Периодический контакт кончика зонда может привести к перетаскиванию липосом при их движении по везикулам в образце	[15–17]

Флуоресцентная микроскопия

Флуоресцентная или «эпифлуоресцентная» микроскопия – особая форма световой микроскопии, в которой используется способность флуорохромов излучать свет после его поглощения [22]. Метод широко используется в биофизике для получения информации о структуре и динамике компонентов мембран [4]. В таких исследованиях для визуализации структуры исследуемых мембран в них внедряют флуоресцентные зонды. На рынке представлен большой ассортимент флуоресцентных красителей с различными свойствами. Например, некоторые флуоресцентные красители рассчитаны на определенную мембранную среду с различным расположением и латеральной упаковкой [4]. Для получения информации о самой структуре мембраны можно одновременно применять несколько флуоресцентных зондов в образце, помещая их как в водный слой, так и в липидный бислой липосом [2]. Такое расположение может быть полезно при просмотре GUVs для получения информации о форме, размере и текучести липидных везикул [4, 5]. Для визуализации ламеллярности липосом можно также непосредственно в липидный бислой включать зонды, такие как липиды, меченные родамином [2].

Недостатком флуоресцентной микроскопии является то, что добавление зондов и красителей к мембранной системе может влиять на свойства липосомальной системы доставки [2, 4, 22], вызывать значительные изменения в мембране хозяина и/или появление экспериментальных артефактов и тем самым приводить к неточной интерпретации данных [4]. Однако низкие концентрации флуоресцентного красителя (<1 моль%), как было показано, не оказывали существенного влияния на физические свойства мембраны [4]. В то же время длительное воздействие флуоресцентного света может привести к обесцвечиванию и потере интенсивности флуоресценции. Поэтому выбор красителя и разработка новых мембранных зондов являются важными факторами при использовании флуоресцентной микроскопии [5].

Вместе с тем физико-химическое зондирование может быть применено при оценке качества и стандартности приготовления образцов липосом.

Конфокальная микроскопия

Конфокальная сканирующая микроскопия стала достижением в области флуоресцентной микроскопии. Вместо освещения всего образца изображение строится путем сканирования одного (или нескольких) сфокусированных лучей света по образцу. Свет, возвращающийся от освещенного объекта, проходит через апертуру, которая отсекает расфокусированный свет сверху и снизу интересующей плоскости, гарантируя получение изображений только с небольшой глубиной резкости, что значительно улучшает

разрешение вне плоскости [2, 23]. При этом собирается «z-стопка» изображений, начиная с верхней части везикулы, за которыми следуют изображения, сделанные с определенными z-приращениями до нижней части образца, в результате получается его составное трехмерное изображение [2, 23]. Конфокальная сканирующая микроскопия более предпочтительна по сравнению с эпифлуоресцентной благодаря лучшей четкости изображения. В случае GUVs метод способен визуализировать внутреннюю структуру липидных систем, что зачастую невозможно при использовании других методов микроскопии [6, 7]. Однако конфокальная микроскопия по-прежнему ограничена дифракцией и, следовательно, не может создавать высокой четкости изображения SUVs или олигомеллярных липосом [7].

Методы электронной микроскопии

Электронная микроскопия – метод визуализации везикул при очень большом увеличении [24, 25]. Широко используется для характеристики липидных везикул, поскольку длина волны электронов (и, следовательно, разрешение, ограниченное дифракцией) на много порядков ниже, чем у оптической микроскопии, и, следовательно, обеспечивает сверхразрешение для четкой визуализации небольших липосом [2, 7]. При этом используется пучок электронов, фокусируемый на поверхности объекта с помощью различных электромагнитных линз. Электроны рассеиваются образцом, а затем перефокусируются и увеличиваются с помощью следующей серии электромагнитных линз в колонне визуализации для создания проецируемого изображения [24]. Существует несколько различных типов электронных микроскопов, каждый из которых требует своей пробоподготовки.

Сканирующая электронная микроскопия (SEM)

Метод сканирующей электронной микроскопии является электронно-оптическим методом наблюдения (визуализации) и исследования изображений поверхности, а также получения информации о составе и некоторых других свойствах испытуемых образцов веществ¹. По сравнению с традиционной оптической (световой) микроскопией² SEM позволяет исследовать испытуемые образцы при более высоких увеличениях (например, 250 000× по сравнению с увеличением 1000× в оптической микроскопии), с большим разрешением по плоскости

¹ ОФС.1.2.1.0001 «Сканирующая электронная микроскопия». Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-1/skaniruyushchaya-elektronnaya-mikroskopiya/> Ссылка активна на 29.08.2024.

² ОФС.1.2.1.0009 «Оптическая микроскопия». Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-1/opticheskaya-mikroskopiya/> Ссылка активна на 29.08.2024.

(например, 3 нм или больше по сравнению с примерно 200 нм в оптической микроскопии), а также с большей глубиной резкости. Adler et Schiemann в 1984 г. впервые попытались использовать SEM для характеристики липосом [26]. Они установили, что применение метода сублимационной сушки для подготовки образцов липосом для SEM привело к образованию большого количества видимых комков и коркового материала [26]. Более поздние исследования показали, что сама структура липосом может подвергаться изменениям из-за условий глубокого вакуума и процессов окрашивания, необходимых для этого метода [7]. Поэтому в настоящее время для анализа липосом SEM, как правило, не используется [7]. Однако с его помощью можно получить общую информацию о структуре различных липидных слоев, о размере и морфологии препарата [8].

Просвечивающая (трансмиссионная) электронная микроскопия (ТЕМ)

Просвечивающая электронная микроскопия – наиболее часто используемый метод визуализации для оценки структуры наночастиц [24, 27]. Он предполагает подготовку тонкого образца (толщиной <100 нм), который помещается в вакуумную камеру. Электронный луч пересекает образец, фокусируется и формирует изображение. ТЕМ может легко отображать мягкие образцы с пространственным разрешением размером значительно ниже 1 нм [7, 12, 24].

Метод можно классифицировать в зависимости от используемого способа пробоподготовки: отрицательное окрашивание, замораживание и разрушение, криогенная ТЕМ. Он может предоставить информацию о поверхностных модификациях наночастиц, так как обеспечивает лучший контраст и контур изображений по сравнению с другими методами микроскопии. Например, конъюгация трансферрина с поверхностью липосом DSPC/холестерина показала образование на поверхности частиц покрытия с негативным окрашиванием ТЕМ, которое отсутствовало в препаратах неконъюгированных липосом [28]. В другом эксперименте перед процедурой негативного окрашивания были добавлены специфические антитела, выработанные против трансферрина человека, для подтверждения идентичности поверхностного покрытия частиц [28]. Таким образом, ТЕМ позволяет добиться значительного улучшения разрешения при оценке конъюгации лигандов с поверхностью липосом.

Техника негативного окрашивания

При проведении ТЕМ с негативным окрашиванием пробоподготовка включает в себя помещение небольшого количества гидратированного образца на сетку. При этом следует учитывать, что, поскольку везикулы находятся в непосредственном контакте с сеткой, их ориентация и морфология могут меняться [2]. Для

обеспечения высокого контраста при рассматривании везикул на темном фоне необходимо внедрить липосомы в подходящий электронно-плотный материал (например, соли тяжелых металлов, такие как уранилацетат или фосфорновольфрамовая кислота) [7]. Техника негативного окрашивания относительно быстрая и простая, однако может вызывать изменение исходной структуры липосом, приводить к образованию светлых и темных полос, которые ошибочно принимаются за ламеллярные структуры [2, 7]. Кроме того, помещение образца под вакуум приводит к дальнейшему его обезвоживанию и вновь может вызвать изменения в структуре везикул [2]. Хотя метод ТЕМ с негативным окрашиванием обеспечивает гораздо большее увеличение для визуализации наночастиц, повреждение структуры липосом затрудняет точную оценку их морфологических характеристик. Поэтому для подтверждения результатов обычно требуются другие методы визуализации.

Криоэлектронная микроскопия (Крио-ТЕМ)

Криогенная ТЕМ (крио-ТЕМ) представляет собой разновидность ТЕМ, в которой перед визуализацией используются тонкие водные гидратированные пленки, остеклованные в жидком этане. Метод позволяет анализировать липосомы в наиболее нативном состоянии и является ценным инструментом для определения их размера, формы, внутренней структуры и ламеллярности. В зависимости от толщины образца можно добиться разрешения до 5 нм [25]. Основным преимуществом быстрого замораживания образцов липосом является минимизация образования кристаллов льда и сохранение белков, мРНК и других материалов [2, 12, 29], что актуально, когда белки или ДНК инкапсулированы внутри наночастиц [12]. Крио-ТЕМ позволяет избежать проблем с химической фиксацией, обезвоживанием, разрезанием и окрашиванием, которые могут повлиять на морфологию везикул [2]. С помощью данного метода можно отследить влияние мольного соотношения активной молекулы и липидов на морфологию везикул. Так, в работе [9] при мольном соотношении 0,05 липосомы ожидаемо напоминали по форме кофейные зерна с нанокристаллом доксорубина внутри, а при увеличении соотношения (0,37) обнаруживались даже треугольные структуры, в которых три нанокристалла доксорубина образовывали правильный треугольник в пределах одной липосомы. В работе [10] о включении винкристина, винбластина и винорелбина во внутреннюю полость липосом судили по увеличенной электронной плотности внутренней полости липосом по сравнению с изображениями контрольных незагруженных везикул. В лаборатории Y. Varenholz по криоэлектронным 2D-микрофотографиям предложен подход к реконструкции 3D-структуры липосом [11], который позволяет получать дополнительную информацию о распределении препарата в везикулах.

Электронная микроскопия с замораживанием и разрушением

Метод замораживания и разрушения не требует процесса сушки и может предоставить дополнительную информацию о внутренней структуре наночастиц [12]. Предполагается размещение образца на сетке TEM, зажатой между двумя медными или золотыми держателями. Образец остекловывается путем быстрого замораживания жидким пропаном или жидким азотом, а затем разрушается по областям образца со слабыми молекулярными взаимодействиями. Поверхность излома можно дополнительно протравить и затенить тонким слоем платины или углерода для создания «негативной» копии плоскости образца излома. Перед визуализацией реплику очищают органическим растворителем. Реплики стабильны, их можно сохранить и просмотреть позже [12]. Основным преимуществом метода является то, что реплики точно отражают нативное состояние образца и позволяют получить подробную информацию о трехмерной структуре везикул и двухслойной организации: мультислойную конструкцию и двухслойную упаковку мультислойных везикул [2, 12, 13]. Метод позволяет также оценить размер агрегатов и полезен для изучения взаимодействия катионных липосом с ДНК [2]. Однако во время подготовки из-за недостаточной скорости замораживания, повторного осаждения молекул растворителя и/или механического напряжения в образце все равно могут возникать артефакты. Например, на SUVs из выборки может возникнуть «эффект ряби» [2], которая является обычной бислойной деформацией, возникающей из-за беспорядка в переходах ацильных цепей перед замораживанием. Кроме этого, вызывать «рябь» может и инкубация везикул между температурой, предшествующей переходу, и фактической температурой перехода [2]. Данный факт можно использовать для получения информации о фазовых переходах, происходящих при использовании для липосомальных препаратов липидов различной природы [2].

Средовая сканирующая электронная микроскопия

Средовая сканирующая электронная микроскопия (ESEM) дает возможность визуализировать липосому в ее гидратированном состоянии без предварительной подготовки образца. Y. Perrie et al. первыми применили ESEM для изучения липосом и смогли в режиме реального времени динамически следить за гидратацией липидных пленок и изменениями в суспензиях липосом по мере конденсации воды на образце или испарения. Было получено представление об устойчивости липосом к слиянию во время обезвоживания и альтернативный анализ состава и стабильности липосом [14]. Особенностью ESEM является наличие водяного пара в камере микроскопа. Под-

держка содержащей воду атмосферы вокруг образца обусловлена использованием многоапертурной градуированной вакуумной системы, позволяющей камере визуализации создавать давление до 55 гПа [2, 7, 14]. Первичный электронный луч может генерировать вторичные электроны, которые сталкиваются с молекулами пара, что приводит к каскадному усилению сигнала до достижения им детектора.

Метод широко применяется для оценки стабильности липосом, для анализа загрузки ЛС в их бислой [30], а также для определения размера и формы везикул. Однако ESEM не позволяет получить подробную информацию о ламеллярности и внутреннем строении наноразмерных структур [7].

Атомно-силовая микроскопия

Атомно-силовая микроскопия (Atomic force microscopy, AFM), также известная как сканирующая силовая микроскопия (Scanning-force microscopy, SFM), представляет собой разновидность метода сканирующей зондовой микроскопии, которая осуществляется путем проведения острого наконечника, прикрепленного к кантилеверу и датчику, по поверхности образца и измерения поверхностных сил между ним и зондом [31, 32]. При движении по поверхности кантилевер перемещается вверх и вниз, то есть отклоняется, что измеряется количественно с помощью оптического датчика [31]. AFM используют для изображения биологических образцов, а также наночастиц, метод не требует работы в вакууме и может применяться в окружающем воздухе или под жидкостью [32]. AFM имеет разрешение порядка долей нанометра и может обеспечить трехмерное изображение липосом вместе с подробной информацией о морфологии, распределении по размерам, однородности и стабильности [32]. В работе [15] показана применимость метода для 3D-анализа популяции липосом, загруженных доксорубицином: везикулы с наибольшими кристаллами доксорубицина приобретали вытянутую форму; данные подтверждали методом криоэлектронной микроскопии. AFM можно использовать и для характеристики поверхностных модификаций липосом и обнаружения лигандов (например, антител и полимеров), конъюгированных с липосомальной поверхностью. AFM позволяет также получить информацию о механических и химических свойствах поверхности образца [16]. Одним из ограничений AFM является необходимость адсорбции наночастиц на опорных поверхностях, таких как слюдяные или кремниевые пластины, что может изменить размер и форму везикул и вызвать их уплощение [16], кроме этого, периодический контакт кончика зонда может приводить к перетаскиванию липосом по подложке. К тому же наконечник кантилевера не может заглянуть под липосому. Несмотря на это, AFM остается полезным инструментом для оценки липосом [17].

ФАРМАКОКИНЕТИКА И БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Биологическая эффективность ЛС, доставляемых в липосомах, зависит от фармакокинетических параметров липосом (абсорбции, распределения, метаболизма и выведения). Как правило, судьба инкапсулированной ЛС определяется физико-химическими особенностями липосом; однако, как только ЛС высвобождается, ее судьба определяется свойствами самой молекулы [33].

Взаимодействие липосом с системами *in vivo* чрезвычайно сложно. При оценке фармакокинетики обычно рассчитывают максимальную концентрацию ЛС (C_{max}), время достижения максимальной концентрации (t_{max}), площадь под кривой «концентрация – время» (AUC_{plasma}), время удерживания ЛС в организме (MRT) и др. На фармакокинетический профиль липосомальных лекарственных форм влияют различные физико-химические свойства, включая природу ЛС, ее дозировку, липидный состав, размер липосом, зета-потенциал, стерическую стабилизацию и способ введения [34]. Несмотря на то, что основным путем введения липосомальных препаратов является внутривенный, проводятся исследования с липосомами для внутриглазного [35], внутримышечного [36], ингаляционного [37], интраназального [38], перорального [29], трансдермального [39] и подкожного [40] введения. Рассмотрим некоторые особенности фармакокинетики липосом в зависимости от вышеперечисленных факторов.

При оценке эффективности липосом для доставки ЛС в мозг после интраназального введения рекомендуются показатели эффективности нацеливания лекарственного средства (DTE), процент транспорта лекарственного средства (DTP), BIN/IV и RB, которые рассчитывают по следующим формулам [38]:

$$DTE = \frac{(AUC_{brain, IN}) / (AUC_{plasma, IN})}{(AUC_{brain, IV}) / (AUC_{plasma, IV})},$$

$$DTP = \frac{AUC_{brain, IN} - \frac{AUC_{brain, IV}}{AUC_{plasma, IV}} \cdot AUC_{plasma, IN}}{AUC_{brain, IN}} = 1 - \frac{1}{DTE} = 1 - \frac{100}{DTE\%},$$

$$B_{IN/IV} = \frac{AUC_{brain, IN}}{AUC_{brain, IV}},$$

$$RB = \frac{AUC_{brain, liposomes} (IN)}{AUC_{brain, free drug} (IN)},$$

где $AUC_{brain, liposomes}$ – площадь под кривой «концентрация – время» в тканях мозга после интраназального (IN) или внутривенного (IV) введения; BIN/IV – биодоступность препарата в тканях мозга после IN-введения по сравнению с IV-введением; RB – био-

доступность липосомального препарата по сравнению со свободным препаратом в тканях мозга после IN-введения.

DTE используется для оценки того, нацеливаются ли липосомы после интраназального введения на мозг лучше, чем свободные препараты или липосомы после внутривенного введения. $DTE\% > 100$ указывает на эффективное нацеливание на мозг. Значения DTP указывают долю (или процент) препаратов, поступающих в мозг через обонятельный и тройничный пути. DTP% варьируется от 0 до 100. $DTP = 0\%$ предполагает отсутствие доставки из носа в мозг прямым путем, тогда как $DTP = 100\%$ указывает на отсутствие проникновения препарата через ГЭБ. Более высокие значения DTE и DTP для интраназальных липосом, чем для растворов ЛС после интраназального введения, указывают на эффективность липосом для доставки ЛС в мозг [41]. В некоторых исследованиях липосомы после интраназального введения имели высокие значения DTE и DTP, что указывает на доставку ЛС в мозг, например $DTE = 2903\text{--}3870\%$ и $DTP = 95,6\text{--}97,4\%$ для липосом, нагруженных байкалином [42], и $DTE = 302,22\%$ и $DTP = 63,66\%$ для липосом, нагруженных цикловиробуксином D [43].

Фармакокинетические исследования на крысах показали, что инкапсуляция эксендина-4, модифицированного пальмитиновой кислотой в мультивезикулярные липосомы, приводила к повышению стабильности ЛС и замедлению периода полувыведения ЛС с 2,4 ч до 77,3 ч после однократной внутримышечной инъекции. Стабильная концентрация ЛС в плазме поддерживалась в течение 168 ч, а относительная биодоступность была 664,18% [36].

Липосомы с сальвианоловой кислотой B, состоящие из насыщенных нейтральных и анионных фосфолипидов, обладали повышенной проницаемостью по сравнению с липосомами, состоящими из ненасыщенных фосфолипидов и катионных фосфолипидов, после ингаляционного введения мышам. В группе мышей, леченных липосомами, AUC_{0-t} были в 2,4 раза выше, чем в группе, получавшей сальвианоловую кислоту B [37].

Липосомы считаются перспективными системами доставки лекарств в легкие благодаря их способности повышать растворимость плохо растворимых в воде ЛС, замедленному высвобождению, длительному времени циркуляции, специфичности, биосовместимости и стабильности [44]. Использование липосом для доставки лекарств в легкие может значительно увеличить время пребывания препарата в легких, одновременно снижая клиренс. Прямая инстилляция ПЭГилированных липосом с нинтеданибом в легкие мышей увеличивает доставку ЛС в 8000 раз, а период полувыведения из легких – в десять раз по сравнению с пероральным нинтеданибом [45].

Роговой слой функционирует как основной путь для внутриглазной абсорбции. Он служит сильным барьером, препятствующим абсорбции как липо-

фильных, так и гидрофильных молекул для доставки ЛС. Недостаточная абсорбция роговицей и ограниченное удержание в глазу являются основными проблемами, связанными с обычными формулами для местного глазного применения. Липосомы с гидрохлоридом берберина и хризофанолом, покрытые полиамидоаминовым дендримером PAMAM G3.0, продемонстрировали значительную клеточную проницаемость в эпителиальных клетках роговицы человека и улучшенную биоадгезию на эпителии роговицы кролика. Липосомы значительно улучшили биодоступность берберина и оказали защитные эффекты в пигментных эпителиальных клетках сетчатки человека и сетчатке крыс после фотоокислительного повреждения сетчатки [46]. Липосомы, состоящие из 63 моль% фосфолипида и 37 моль% холестерина, содержащие дексаметазон и антибиотик моксифлоксацин, обеспечивали дифференциальное высвобождение ЛС (быстрое высвобождение антибиотика и медленное высвобождение стероида в течение 1 дня) в эксперименте на склеральных тканях глаз кролика [35].

Липосомы, состоящие из фосфатидилхолина, холестерина и левотетрагидропальматина в соотношении 10:1:3, включали в гель и наносили на кожу крыс. После трансдермального нанесения максимальная концентрация (C_{max}) левотетрагидропальматина (ЛТП) из липосомального геля составила 0,16 мкг/мл, а время достижения этой максимальной концентрации (t_{max}) – 1,2 ч. Относительная биодоступность ЛТП в липосомальном геле составила 233,8% по сравнению с эмульсией [47]. Трансферосомы из яичного лецитина Phospholipon® 90G и полидоканол Brij-35®, загруженные бензтропина мезилатом (БЗМ), полученные методом тонкопленочной гидратации, по сравнению с водным раствором БЗМ продемонстрировали значительное увеличение трансдермального проникновения в исследовании *ex vivo* на изолированной коже крысы. По сравнению с внутривенным и пероральным введением фармакокинетические исследования *in vivo* на крысах Wistar после трансдермальной аппликации геля с трансферосомами показали увеличение AUC, T_{max} и MRT в 1,5–2 раза, 5–10 раз и 5–15 раз соответственно, а также более высокое и продолжительное высвобождение БЗМ из гелевых формул, загруженных трансферосомами [48].

Терапия нуклеиновыми кислотами открывает большие возможности для профилактики и лечения различных заболеваний [49]. Однако существует ряд проблем: доставка функциональной нуклеиновой кислоты к целевой ткани без деградации в биологических жидкостях и защита мРНК от быстрого поглощения. Подавляющее большинство липосомальных препаратов вводят парентерально, поскольку пероральное введение ограничено деградацией и дестабилизацией активных ингредиентов из-за низкого pH в желудке, а также ферментов в желудочно-кишечном тракте, что приводит к незначительной перораль-

ной биодоступности. Тем не менее пероральный путь введения остается наиболее предпочтительным для пациентов. Пероральная доставка нуклеиновых кислот затруднена в связи с их незначительной пероральной биодоступностью. При пероральном введении возникает стерический барьер – слой слизи, которая представляет собой вязкий слой, выстилающий весь ЖКТ. Этот барьер ограничивает пероральную доставку макромолекулярных препаратов. Он состоит из покрытого протеогликанами белка муцина, секретируемого бокаловидными клетками эпителия ЖКТ [50]. Он обновляется с высокой скоростью и является частью иммунитета слизистой оболочки, улавливая и удаляя инородные структуры до того, как они смогут достичь подлежащего эпителия. Этот процесс называется клиренсом слизистой оболочки и еще больше снижает пероральную биодоступность ЛС [51]. Для проникновения липосом через слизистую их покрывают гидрофильными или катионными олигомерами или полимерами, предпочтительно проникающими в клетку пептидами (cell-penetrating peptides, CPP). Для пероральной доставки мРНК предпочтительна модификация поверхности липосом циклическим CPP, богатым аргинином, благодаря повышенной стабильности циклических CPP по сравнению с линейными в желудочно-кишечных жидкостях [29].

Биораспределение

Липосомальное биораспределение, то есть распространение липосом по всему организму (часто в легких, почках, печени, селезенке, желудке, кишечнике, мозге), может быть изменено за счет включения в них различных молекулярных компонентов.

Липосомы привлекли внимание в области доставки ЛС от рака благодаря способности доставлять токсичные вещества к опухолевым клеткам. Накоплению липосом внутри опухоли способствует эффект повышенной проницаемости и удержания (ЭПР). Предполагается, что эффект ЭПР является результатом неплотной сосудистой сети и нарушения лимфатической системы в опухолях. Накопление ЛС в раковых клетках за счет эффекта ЭПР усиливается липосомами с пролонгированным действием. Так, в работе [52] показано, что эндотрахеальное введение липосомального рифабутина крысам привело не только к повышению концентрации действующего вещества в месте введения (в легких) по сравнению с введением чистого рифабутина, но и к многократному увеличению его относительной биодоступности, периода полувыведения и среднего времени удержания. Интраназальное введение ривастигмина кроликам показало увеличение биодоступности ЛС в тканях мозга в 10 раз по сравнению с субстанцией [53]. Ряд авторов наблюдали более медленное появление препаратов в крови после внутрибрюшинного и подкожного введения липосом по сравнению с внутривенным [54].

На накопление липосом в опухоли влияют также размер липосом [55], эластичность [56] и поверхностный заряд [57]. Эластичность липосом модифицируется за счет включения холестерина, поверхностно-активных веществ и липидов с различной длиной ацильной цепи и степенью насыщения. Установлена обратная зависимость накопления липосом в опухолях от модуля Юнга [56]. Модуляция поверхностного заряда липосом показала более значительное накопление анионных липосом внутри опухолей по сравнению с их катионными или нейтральными аналогами [58]. С целью повышения накопления липосом в опухоли исследовались способы модификации их поверхности, такие как конъюгация пептидов или антител, для обеспечения нацеливания на сверхэкспрессированные рецепторы больных клеток [59].

Установлено, что липосомы могут взаимодействовать с белками плазмы, тем самым оказывая влияние на их судьбу *in vivo*, либо на их стабильность, либо модулируя их последующее взаимодействие с клетками-мишенями [60]. Взаимодействие с белками плазмы может извлекать или заменять липиды из носителя, нарушая его целостность. Медиаторы клиренса включают опсонины белков плазмы, фибронектин, С-реактивный белок (CRP), фрагмент компонента C3b, β 2-гликопротеин I или Fc-часть иммуноглобулина G (IgG). Опсонизация может поставить под угрозу стабильность липосом и способствовать эндцитозу или фагоцитозу макрофагов РЭС. Почечная экскреция может представлять собой значительную часть общего клиренса наночастиц диаметром <4–8 нм, но не влияет на клиренс большинства липосомальных составов (>30 нм) [61].

Способность липосом напрямую взаимодействовать с поверхностями конъюнктивы и роговицы представляет собой важное, заметное преимущество. Эффективность липосомальных форм зависит от процента загрузки ЛС, морфологии и заряда липосом, распределения ЛС в липосоме, стабильности липосом в тканях глаза и конъюнктивальном мешке, а также их сродства к поверхности роговицы и скорости высвобождения ЛС из лекарственной формы [34]. При нанесении липосом на слизистую глаз положительно заряженные липосомы, как правило, лучше удерживаются на поверхности роговицы, которая имеет отрицательный заряд. Кроме того, положительно заряженные носители замедляют выведение ЛС со слезной жидкостью за счет повышения вязкости раствора и взаимодействия с отрицательно заряженной слезой [62]. При интравитреальной инъекции анионные ПЭГилированные липосомы размера ~50 нм обладают превосходным распределением и проникновением в клетки сетчатки, в то время как липосомы размером >100 нм не преодолевали витреоретинальный барьер [63]. Липосомы, загруженные дексаметазоном и моксифлоксацином,

в эксперименте на склеральных тканях глаз кролика обеспечивали увеличение времени трансклерального контакта, но сохранили эффективную проницаемость и накопление обоих ЛС от эписклеральной до интраокулярной стороны глаз [35].

Накопление липосом, нацеленных на мозг, должно увеличиваться в мозге и уменьшаться в других нецелевых органах после введения. Успешная доставка в мозг катионных липосом, содержащих мРНК, меченные зеленым флуоресцентным белком GFP и мРНК люциферазы, после интраназального введения была подтверждена флуоресценцией GFP [64].

Было показано, что легочный сурфактант не лизирует и не агрегирует липосомы после ингаляционного введения. Каждый отдел легкого (альвеолярная жидкость, альвеолярные лейкоциты и паренхима) элюирует липосомы в течение 24 ч, вероятно выступая в качестве «депо лекарств». После осаждения в слое сурфактанта липосомы в течение 3–6 ч переносятся в альвеолярные лейкоциты (которые поглощают 1–5 % от общей дозы, введенной в легкие) ненасыщаемым образом. Далее все клеточные слои паренхимы легких поглощают липосомы [45].

Важными преимуществами трансдермальной доставки ЛС являются обход метаболизма первого порядка, нестабильности в желудочно-кишечном тракте и хорошая комплаентность пациентов. Липосомы могут транспортироваться через слои кожи тремя различными путями: трансэпидермальным путем, межклеточным путем и внутриклеточным путем. Роговой слой обычно имеет толщину от 15 до 20 мкм и является гидрофобным, тогда как второй эпидермальный слой, зернистый слой, характеризуется плотными клеточными соединениями. Наличие этих двух слоев создает барьер, который ограничивает способность к проникновению высокомолекулярных гидрофильных частиц (превышающих 500 кДа) в более глубокие дермальные слои кожи. Второй слой кожи под эпидермисом – дерма, состоящая из нескольких подслоев и охватывающая различные придатки, такие как волосные фолликулы, кровь, потовые железы, лимфа и нервы [65]. Для улучшения проникновения через кожу необходимо уменьшение размера липосом, поверхностного барьера или включение пенетрантов [34]. Липосомы на основе гидрогенизированного соевого фосфатидилхолина, 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси (полиэтиленгликоля)-2000] и загруженные трансретиноевой кислотой (лип-атра) наносили на кожу свиней линии Бама. Лип-атра со средним диаметром 83 нм проникали через роговой слой кожи в эпидермис и дерму. Липосомы размером 200–300 нм проникали через дерму на треть хуже [39]. Внешний слой кожи содержит <30 % воды, в то время как внутренний слой состоит примерно из 70 % воды. Этот градиент гидратации внутри эпидермиса играет решающую роль в трансдермальной достав-

ке деформируемых везикул, таких как трансферосомы. Трансферосомы используют этот градиент гидратации. Они проталкиваются во влажные слои эпидермиса через межклеточный путь. Оказавшись в этих более глубоких слоях, неповрежденные трансферосомы могут взаимодействовать с липидами, присутствующими в клетках кожи. В зависимости от своего состава и размера трансферосомы могут сливаться с липидными мембранами клеток кожи, высвобождая инкапсулированную ЛС в целевые слои кожи [66].

Адекватно проведенные исследования по фармакокинетике также могут расцениваться как инструмент визуализации липосом. То есть, если ЛС попадает в мишень и оказывает терапевтическое действие, а свободная ЛС не оказывает эффект на мишень, можно предполагать, что этот эффект обеспечен за счет липосомальной формы. Однако биологическая судьба липосом до конца не изучена. Основные вопросы о том, когда, где и как ЛС высвобождаются из липосом *in vivo*, остаются открытыми. Для корректной интерпретации результатов фармакокинетических исследований необходимо отдельно определить количество ЛС, высвободившейся из липосомы, и всей ЛС, инкапсулированной в липосомы¹. Решение этой задачи ограничено текущими возможностями фармацевтического анализа. Стратегии применения радиационной или флуоресцентной метки не позволяют однозначно различать сигналы высвободившегося ЛС и носителя, что приводит к большим помехам и неопределенности [67]. Некоторые авторы рассматривают ЛС, инкапсулированные в липосомы, как специфическую форму «макропролекарств», которые остаются неактивными, пока не высвободятся в заданной целевой ткани. Например, доксорубин в липосоме должен попасть в ткань, затем высвободиться и проникнуть в ядро целевой клетки, чтобы интеркалироваться в пары оснований ДНК для оказания цитотоксического действия. В этом смысле биодоступным является только ЛС, попавшая в ядро. Но до сих пор внутриопухолевая, внутриклеточная и межъядерная кинетика высвобождения липосомальных препаратов малоизучена и остается в статусе «черного ящика». Концентрация липосомальных препаратов в плазме вряд ли может точно отражать фактическую концентрацию в мишени (т. е. в ядре) [68]. Для корректной оценки количества высвободившейся из липосомы ЛС в ткани или клетках-мишенях и ЛС, оставшейся в липосоме, необходима разработка передовых биоаналитических методов.

¹ Liposome drug products: Chemistry, manufacturing, and controls; human pharmacokinetics and bioavailability; and labeling documentation. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/liposome-drug-products-chemistry-manufacturing-and-controls-human-pharmacokinetics-and>. Accessed: 29.08.2024.

Клиренс

Общий системный клиренс связан с экспозицией и средней равновесной концентрацией в плазме, достигаемой при непрерывном применении ЛС. Непрерывное введение ЛС может включать как режимы инфузии с постоянной скоростью, так и/или схемы многократного дозирования. Общий клиренс липосомальных составов зависит от трех факторов: (1) скорости элиминации самого липосомального носителя; (2) скорости высвобождения инкапсулированного или внедренного в мембрану ЛС из носителя и (3) скорости выведения и метаболизма высвободившегося ЛС, больше не связанного с носителем.

Процессы выведения липосом и других наночастиц из кровотока описаны в литературе [61]. На клиренс липосом могут влиять физико-химические факторы, включая размер везикул, липидный состав мембраны и скорость высвобождения содержимого из липосом. На скорость клиренса липосом и период полувыведения из крови большое влияние оказывает липосомальный состав. Составы, увеличивающие время нахождения ЛС в кровотоке, способствуют более высокому накоплению и депонированию их в тканях-мишенях [69]. Например, легочный клиренс обусловлен альвеолярными макрофагами и мукоцилиарной эскалацией в проводящих дыхательных путях. Дендритные клетки также участвуют в легочном клиренсе липосом в лимфатическую систему [44].

Основным механизмом выведения липосом является распознавание и поглощение ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) макрофагами, которые расположены преимущественно в печени и селезенке. И в первую очередь за этот процесс отвечает система мононуклеарных фагоцитов (СМФ), состоящая из тканевых макрофагов и моноцитов крови [70]. Существенно затрудняют доставку ЛС и циркулирующие нейтрофилы [71]. Модификации липосомальной композиции для снижения поглощения СМФ посвящено значительное количество исследований [72, 73].

Липосомальная опсонизация при системном введении заставляет липосомы взаимодействовать с рецепторами на поверхности резидентных макрофагов печени и селезенки СМФ, что впоследствии вызывает их интернализацию и деградацию [74]. Механически аналогичным образом липосомальная опсонизация может также направлять частицы в печень для поглощения гепатоцитами [75].

Включение полиэтиленгликолей (ПЭГ) в липосомальные составы, известные как «скрытые» (stealth) липосомы, увеличивает время циркуляции и, как следствие, период полураспада липосом, препятствуя опсонизации или преимущественно связывая белки, которые уклоняются от поглощения [76]. В процессе изучения фармакокинетики ПЭГилированных липосом с доксирубицином на китайских пациентках с распространенным раком молочной железы было показано, что клиренс ЛС из липосом (0,0247 л/ч) был

значительно замедлен по сравнению с неинкапсулированной субстанцией ($Cl=5,111$ л/ч) [77]. ПЭГилирование липосом придает поверхности гидрофильность, а также создает барьер стерических затруднений, что влияет на связывание сывороточных белков с поверхностью липосом [78]. Липосомы, состоящие в основном из нейтральных фосфолипидов с небольшим молярным процентом отрицательно заряженного гликолипида, главным образом моносиалоганглиозида (МГ), также показали пролонгированную циркуляцию *in vivo*. Механически МГ снижает липосомальную опсонизацию за счет стерических препятствий, создаваемых отрицательно заряженной сиаловой кислотой и физической границей, обеспечиваемой углеводными цепями [79].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Существует широкий спектр методов визуализации, доступных для оценки морфологии липосом и их качества, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. Световая микроскопия может относительно быстро предоставить общие сведения о размере и форме более крупных везикул, а также однородности образца. И наоборот, ТЕМ является наиболее часто используемым методом для более детального изучения морфологии липосом; однако при интерпретации результатов необходимо учитывать возможность структурных изменений для каждого подтипа ТЕМ из-за окрашивания и/или воздействия условий вакуума. ESEM наиболее полезен при определении липосомальных изменений в ответ на окружающую среду, тогда как AFM становится полезным методом морфологического анализа наночастиц и обеспечивает максимальное разрешение липосомальной поверхности. И AFM, и ТЕМ способны визуализировать лиганды, конъюгированные с поверхностью липосом, и предоставить дополнительную информацию о модификациях поверхности. В целом выбор метода зависит от того, какие морфологические характеристики и степень детализации требуются. Кроме того, в процессе выбора важно понимать потенциальные последствия метода подготовки проб для каждого метода визуализации.

Фармакокинетика липосомальных форм определяется множеством факторов, таких как природа ЛС, дозировка, липидный состав, размер липосом, заряд, покрытие липосом вспомогательными веществами и способ введения. Кроме того, взаимодействие липосомальных форм с иммунной системой, ретикулоэндотелиальной системой и компонентами крови играет важную роль в их абсорбции и выведении из организма. Важно отметить, что модификация поверхности липосом (например, ПЭГилирование) может влиять на их взаимодействие с клетками, биожидкостями организма и органами. Лучшее понимание фармакокинетики и биораспределения липосомальных форм необходимо для разработки современных лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Осочук С. С., Коцур Ю. М., Пожарицкая О. Н., Флисюк Е. В., Смехова И. Е., Малков С. Д., Зарифи К. О., Титович И. А., Красова Е. К., Шиков А. Н. Липосомы – метаболически активные транспортные системы лекарственных средств: классификация, составные компоненты, способы изготовления и стабилизации. Часть 1. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;4. DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-4-1867.
2. Bibi S., Kaur R., Henriksen-Lacey M., McNeil S. E., Wilkhu J., Lattmann E., Christensen D., Mohammed A. R., Perrie Y. Microscopy imaging of liposomes: from coverslips to environmental SEM. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;417(1–2):138–150. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.12.021.
3. Nallamotheu R., Wood G. C., Pattillo C. B., Scott R. C., Kiani M. F., Moore B. M., Thoma L. A. A tumor vasculature targeted liposome delivery system for combretastatin A4: Design, characterization, and in vitro evaluation. *AAPS PharmSciTech*. 2006;7(2):E32. DOI: 10.1208/pt070232.
4. Bouvrais H., Pott T., Bagatolli L. A., Ipsen J. H., Méléard P. Impact of membrane-anchored fluorescent probes on the mechanical properties of lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2010;1798(7):1333–1337. DOI: 10.1016/j.bbamem.2010.03.026.
5. Klymchenko A. S., Oncul S., Didier P., Schaub E., Bagatolli L., Duportail G., Mély Y. Visualization of lipid domains in giant unilamellar vesicles using an environment-sensitive membrane probe based on 3-hydroxyflavone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2009;1788(2):495–499. DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.10.019.
6. Mertins O., Dimova R. Insights on the interactions of chitosan with phospholipid vesicles. Part II: membrane stiffening and pore formation. *Langmuir*. 2013;29(47):14552–14559. DOI: 10.1021/la4032199.
7. Ruozzi B., Belletti D., Tombesi A., Tosi G., Bondioli L., Forni F., Vandelli M. A. AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study. *International Journal of Nanomedicine*. 2011;6:557–563. DOI: 10.2147/IJN.S14615.
8. Karakas C. Y., Ustundag C. B., Sahin A., Karadag A. Co-axial electrospinning of liposomal propolis loaded gelatin-zein fibers as a potential wound healing material. *Journal of Applied Polymer Science*. 2023;140(46):e54683. DOI: 10.1002/app.54683.
9. Johnston M. J. W., Edwards K., Karlsson G., Cullis P. R. Influence of drug-to-lipid ratio on drug release properties and liposome integrity in liposomal doxorubicin formulations. *Journal of Liposome Research*. 2008;18(2):145–157. DOI: 10.1080/08982100802129372.
10. Zhigaltsev I. V., Maurer N., Akhong Q.-F., Leone R., Leng E., Wang J., Semple S. C., Cullis P. R. Liposome-encapsulated vincristine, vinblastine and vinorelbine: a comparative study of drug loading and retention. *Journal of Controlled Release*. 2005;104(1):103–111. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.01.010.
11. Damari S. P., Shamrakov D., Varenik M., Koren E., Nativ-Roth E., Barenholz Y., Regev O. Practical aspects in size and morphology characterization of drug-loaded nano-liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;547(1–2):648–655. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.06.037.

12. Kuntsche J., Horst J. C., Bunjes H. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;417(1–2):120–137. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.02.001.
13. Resnik N., Romih R., Kreft M. E., Hudoklin S. Freeze-fracture electron microscopy for extracellular vesicle analysis. *Journal of Visualized Experiments*. 2022;187:e63550. DOI: 10.3791/63550.
14. Perrie Y., Ali H., Kirby D. J., Mohammed A. U. R., McNeil S. E., Vangala A. Environmental scanning electron microscope imaging of vesicle systems. *Methods in Molecular Biology*. 2017;1522:131–143. DOI: 10.1007/978-1-4939-6591-5_11.
15. Takahashi N., Higashi K., Ueda K., Yamamoto K., Moribe K. Determination of nonspherical morphology of doxorubicin-loaded liposomes by atomic force microscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;107(2):717–726. DOI: 10.1016/j.xphs.2017.10.009.
16. Ruozì B., Tosi G., Leo E., Vandelli M. A. Application of atomic force microscopy to characterize liposomes as drug and gene carriers. *Talanta*. 2007;73(1):12–22. DOI: 10.1016/j.talanta.2007.03.031.
17. Ле-Дейген И. М., Скуредина А. А., Кудряшова Е. В. Экспериментальные методы исследования механизма взаимодействия липидных мембран с низкомолекулярными лекарствами. *Биоорганическая химия*. 2020;46(4):340–359. DOI: 10.31857/S013234232004017X.
18. Швецов И. С. Влияние pH среды гидратируемого раствора на морфологические характеристики лецитиновых липосом. *Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки*. 2021;(5):236–240. DOI: 10.37882/2223-2966.2021.05.36.
19. Бурдаев Н. И., Николаева Л. Л., Косенко В. В., Шпрах З. С., Бунятян Н. Д. Липосомы как носители лекарственных средств: классификация, методы получения и применение. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(2–1):316–332. DOI: 10.30895/1991-2919-2023-508.
20. Bagatolli L. A. Membranes and Fluorescence Microscopy. *Reviews in Fluorescence*. 2009;33–51. DOI: 10.1007/978-0-387-88722-7_2.
21. Murphy D. B., Davidson M. W. Polarization Microscopy. In: *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2012. P. 153–171. DOI: 10.1002/9781118382905.
22. Murphy D. B., Davidson M. W. Fluorescence Microscopy. In: *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2012. P. 199–231. DOI: 10.1002/9781118382905.ch11.
23. Murphy D. B., Davidson M. W. Confocal Laser Scanning Microscopy. In: *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2012. P. 265–305. DOI: 10.1002/9781118382905.ch13.
24. Henry C. R. Morphology of supported nanoparticles. *Progress in Surface Science*. 2005;80(3–4):92–116. DOI: 10.1016/j.progsurf.2005.09.004.
25. Robson A.-L., Dastoor P. C., Flynn J., Palmer W., Martin A., Smith D. W., Woldu A., Hua S. Advantages and limitations of current imaging techniques for characterizing liposome morphology. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:328115. DOI: 10.3389/fphar.2018.00080.
26. Adler K., Schiemann J. Characterization of liposomes by scanning electron microscopy and the freeze-fracture technique. *Micron and Microscopica Acta*. 1985;16(2):109–113. DOI: 10.1016/0739-6260(85)90039-5.
27. Baxa U. Imaging of liposomes by transmission electron microscopy. *Methods in Molecular Biology*. 2018;1682:73–88. DOI: 10.1007/978-1-4939-7352-1_8.
28. Anabousi S., Laue M., Lehr C.-M., Bakowsky U., Ehrhardt C. Assessing transferrin modification of liposomes by atomic force microscopy and transmission electron microscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005;60(2):295–303. DOI: 10.1016/j.ejpb.2004.12.009.
29. Dürr V., Wohlfart S., Eisenzapf T., Mier W., Fricker G., Uhl P. Oral Delivery of mRNA by Liposomes Functionalized with Cell-Penetrating Peptides. *Applied Nano*. 2023;4(4):293–308. DOI: 10.3390/applnano4040017.
30. Mohammed A. R., Weston N., Coombes A. G. A., Fitzgerald M., Perrie Y. Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004;285(1–2):23–34. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2004.07.010.
31. Sitterberg J., Özçetin A., Ehrhardt C., Bakowsky U. Utilising atomic force microscopy for the characterisation of nanoscale drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010;74(1):2–13. DOI: 10.1016/j.ejpb.2009.09.005.
32. Engelhardt K., Preis E., Bakowsky U. Visualization and characterization of liposomes by atomic force microscopy. In: *Liposomes. Methods and Protocols*. New York: Springer Nature; 2023. P. 253–263. DOI: 10.1007/978-1-0716-2954-3_23.
33. Sheikholeslami B., Lam N. W., Dua K., Haghi M. Exploring the impact of physicochemical properties of liposomal formulations on their in vivo fate. *Life Sciences*. 2022;300:120574. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120574.
34. Paramshetti S., Angolkar M., Talath S., Osmani R. A. M., Spandana A., Al Fatease A., Hani U., Ramesh K. V. R. N. S., Singh E. Unravelling the in vivo dynamics of liposomes: Insights into biodistribution and cellular membrane interactions. *Life Sciences*. 2024;346:122616. DOI: 10.1016/j.lfs.2024.122616.
35. Su J., Lu W., Guo Y., Liu Z., Wang X., Yan H., Zhang R. X. Depot unilamellar liposomes to sustain transscleral drug Co-delivery for ophthalmic infection therapy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2023;86:104629. DOI: 10.1016/j.jddst.2023.104629.
36. Tian H., Chang M., Lyu Y., Dong N., Yu N., Yin T., Zhang Y., He H., Gou J., Tang X. Intramuscular injection of palmitic acid-conjugated Exendin-4 loaded multivesicular liposomes for long-acting and improving in-situ stability. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2024;21(1):169–185. DOI: 10.1080/17425247.2024.2305110.
37. Peng J., Wang Q., Sun R., Zhang K., Chen Y., Gong Z. Phospholipids of inhaled liposomes determine the in vivo fate and therapeutic effects of salvianolic acid B on idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of Controlled Release*. 2024;371:1–15. DOI: 10.1016/j.jconrel.2024.05.026.
38. Duong V.-A., Nguyen T.-T.-L., Maeng H.-J. Recent advances in intranasal liposomes for drug, gene, and vaccine delivery. *Pharmaceutics*. 2023;15(1):207. DOI: 10.3390/pharmaceutics15010207.

39. Liu J., Zheng A., Peng B., Xu Y., Zhang N. Size-dependent absorption through stratum corneum by drug-loaded liposomes. *Pharmaceutical Research*. 2021;38:1429–1437. DOI: 10.1007/s11095-021-03079-9.
40. Li H., Tang Q., Wang Y., Li M., Wang Y., Zhu H., Geng F., Wu D., Peng L., Zhao G., Zou L., Shi S. Injectable thermo-sensitive lipo-hydrogels loaded with ropivacaine for prolonging local anesthesia. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022;611:121291. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.121291.
41. Pokharkar V., Patil-Gadhe A., Palla P. Efavirenz loaded nanostructured lipid carrier engineered for brain targeting through intranasal route: In-vivo pharmacokinetic and toxicity study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;94:150–164. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.07.067.
42. Xiang Y., Long Y., Yang Q., Zheng C., Cui M., Ci Z., Lv X., Li N., Zhang R. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicity of Baicalin liposome on cerebral ischemia reperfusion injury rats via intranasal administration. *Brain Research*. 2020;1726:146503. DOI: 10.1016/j.brainres.2019.146503.
43. Wei H., Liu T., Jiang N., Zhou K., Yang K., Ning W., Yu Y. A novel delivery system of cyclovirobuxine D for brain targeting: Angiopep-conjugated polysorbate 80-coated liposomes via intranasal administration. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2018;14(7):1252–1262. DOI: 10.1166/jbn.2018.2581.
44. Liu Q., Guan J., Qin L., Zhang X., Mao S. Physicochemical properties affecting the fate of nanoparticles in pulmonary drug delivery. *Drug Discovery Today*. 2020;25(1):150–159. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.09.023.
45. Ferguson L. T., Ma X., Myerson J. W., Wu J., Glassman P. M., Zamora M. E., Hood E. D., Zaleski M., Shen M., Essien E.-O., Shuvaev V. V., Brenner J. S. Mechanisms by which liposomes improve inhaled drug delivery for alveolar diseases. *Advanced NanoBiomed Research*. 2023;3(3):2200106. DOI: 10.1002/anbr.202200106.
46. Lai S., Wei Y., Wu Q., Zhou K., Liu T., Zhang Y., Jiang N., Xiao W., Chen J., Liu Q., Yu Y. Liposomes for effective drug delivery to the ocular posterior chamber. *Journal of Nanobiotechnology*. 2019;17:64. DOI: 10.1186/s12951-019-0498-7.
47. Zhang G., Li X., Huang C., Jiang Y., Su J., Hu Y. Preparation of the Levo-Tetrahydropalmatine Liposome Gel and Its Transdermal Study. *International Journal of Nanomedicine*. 2023;18:4617–4632. DOI: 10.2147/IJN.S422305.
48. Chabru A. S., Salve P. S., Ghumare G. D., Dhamak R. S., Tiwari D. R., Waghmare D. S. Comparative pharmacokinetic studies of transferosomes loaded gel and pressure sensitive adhesive based patch formulation for transdermal delivery of benztropine mesylate. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2024;92:105287. DOI: 10.1016/j.jddst.2023.105287.
49. Yu A.-M., Tu M.-J. Deliver the promise: RNAs as a new class of molecular entities for therapy and vaccination. *Pharmacology & Therapeutics*. 2022;230:107967. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2021.107967.
50. Uhl P., Helm F., Hofhaus G., Brings S., Kaufman C., Leotta K., Urban S., Haberkorn U., Mier W., Fricker G. A liposomal formulation for the oral application of the investigational hepatitis B drug Myrcludex B. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2016;103:159–166. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.03.031.
51. Leal J., Dong T., Taylor A., Siegrist E., Gao F., Smyth H. D. C., Ghosh D. Mucus-penetrating phage-displayed peptides for improved transport across a mucus-like model. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;553(1–2):57–64. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.055.
52. Карлина М. В., Косман В. М., Пожарицкая О. Н., Шиков А. Н., Макарова М. Н., Макаров В. Г., Балабаньян В. Ю. Экспериментальное исследование фармакокинетики рифабутина в липосомальной форме. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2013;(2):37–41.
53. El-Helaly S. N., Abd Elbary A., Kassem M. A., El-Nabrawi M. A. Electrosteric stealth Rivastigmine loaded liposomes for brain targeting: preparation, characterization, ex vivo, bio-distribution and in vivo pharmacokinetic studies. *Drug Delivery*. 2017;24(1):692–700. DOI: 10.1080/10717544.2017.1309476.
54. Rip J., Chen L., Hartman R., van den Heuvel A., Reijerkerk A., van Kregten J., van der Boom B., Appeldoorn C., de Boer M., Maussang D., de Lange E. C. M., Gaillard P. J. Glutathione PEGylated liposomes: pharmacokinetics and delivery of cargo across the blood–brain barrier in rats. *Journal of Drug Targeting*. 2014;22(5):460–467. DOI: 10.3109/1061186X.2014.888070.
55. Dadpour S., Mehrabian A., Arabsalmani M., Mirhadi E., Askarizadeh A., Mashreghi M., Jaafari M. R. The role of size in PEGylated liposomal doxorubicin biodistribution and anti-tumour activity. *IET Nanobiotechnology*. 2022;16(7–8):259–272. DOI: 10.1049/nbt.2.12094.
56. Guo P., Liu D., Subramanyam K., Wang B., Yang J., Huang J., Auguste D. T., Moses M. A. Nanoparticle elasticity directs tumor uptake. *Nature Communications*. 2018;9(1):130. DOI: 10.1038/s41467-017-02588-9.
57. Krasnici S., Werner A., Eichhorn M. E., Schmitt-Sody M., Parnernik S. A., Sauer B., Schulze B., Teifel M., Michaelis U., Naujoks K., Dellian M. Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels. *International Journal of Cancer*. 2003;105(4):561–567. DOI: 10.1002/ijc.11108.
58. Wang H.-X., Zuo Z.-Q., Du J.-Z., Wang Y.-C., Sun R., Cao Z.-T., Ye X.-D., Wang J.-L., Leong K. W., Wang J. Surface charge critically affects tumor penetration and therapeutic efficacy of cancer nanomedicines. *Nano Today*. 2016;11(2):133–144. DOI: 10.1016/j.nantod.2016.04.008.
59. Large D. E., Soucy J. R., Hebert J., Auguste D. T. Advances in receptor-mediated, tumor-targeted drug delivery. *Advanced Therapeutics*. 2019;2(1):1800091. DOI: 10.1002/adtp.201800091.
60. Ishida T., Harashima H., Kiwada H. Liposome clearance. *Bioscience Reports*. 2002;22(2):197–224. DOI: 10.1023/a:1020134521778.
61. Ait-Oudhia S., Mager D. E., Straubinger R. M. Application of pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis to the development of liposomal formulations for oncology. *Pharmaceutics*. 2014;6(1):137–174. DOI: 10.3390/pharmaceutics6010137.
62. Akhter M. H., Ahmad I., Alshahrani M. Y., Al-Harbi A. I., Khalilullah H., Afzal O., Altamimi A. S. A., Najib Ullah S. N. M., Ojha A., Karim S. Drug Delivery Challenges and Current Progress in Nanocarrier-Based Ocular Therapeutic System. *Gels*. 2022;8(2):82. DOI: 10.3390/gels8020082.

63. Tavakoli S., Peynshaert K., Lajunen T., Devoldere J., del Amo E. M., Ruponen M., De Smedt S. C., Remaut K., Urtti A. Ocular barriers to retinal delivery of intravitreal liposomes: Impact of vitreoretinal interface. *Journal of Controlled Release*. 2020;328:952–961. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.10.028.
64. Dhaliwal H. K., Fan Y., Kim J., Amiji M. M. Intranasal delivery and transfection of mRNA therapeutics in the brain using cationic liposomes. *Molecular Pharmaceutics*. 2020; 17(6):1996–2005. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00170.
65. Carter P., Narasimhan B., Wang Q. Biocompatible nanoparticles and vesicular systems in transdermal drug delivery for various skin diseases. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;555:49–62. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.11.032.
66. Matharoo N., Mohd H., Michniak-Kohn B. Transfersomes as a transdermal drug delivery system: Dermal kinetics and recent developments. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2024;16(1):e1918. DOI: 10.1002/wnan.1918.
67. Chen T., He B., Tao J., He Y., Deng H., Wang X., Zheng Y. Application of Förster Resonance Energy Transfer (FRET) technique to elucidate intracellular and In Vivo biofate of nanomedicines. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2019;143:177–205. DOI: 10.1016/j.addr.2019.04.009.
68. Peng T., Xu W., Li Q., Ding Y., Huang Y. Pharmaceutical liposomal delivery—specific considerations of innovation and challenges. *Biomaterials Science*. 2023;11(1):62–75. DOI: 10.1039/D2BM01252A.
69. Allen T. M., Cullis P. R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013;65(1):36–48. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.037.
70. Hume D. A. The mononuclear phagocyte system. *Current Opinion in Immunology*. 2006;18(1):49–53. DOI: 10.1016/j.coi.2005.11.008.
71. Betker J. L., Jones D., Childs C. R., Helm K. M., Terrell K., Nagel M. A., Anchordoquy T. J. Nanoparticle uptake by circulating leukocytes: A major barrier to tumor delivery. *Journal of Controlled Release*. 2018;286:85–93. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.07.031.
72. Giambelluca M., Markova E., Louet C., Steinkjer B., Sundset R., Škalko-Basnet N., Hak S. Liposomes-Human phagocytes interplay in whole blood: effect of liposome design. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2023;54:102712. DOI: 10.1016/j.nano.2023.102712.
73. Mochalova E. N., Egorova E. A., Komarova K. S., Shipunova V. O., Khabibullina N. F., Nikitin P. I., Nikitin M. P. Comparative study of nanoparticle blood circulation after forced clearance of own erythrocytes (mononuclear phagocyte system-cytoblockade) or administration of cytotoxic doxorubicin- or clodronate-loaded liposomes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(13):10623. DOI: 10.3390/ijms241310623.
74. Large D. E., Abdelmessih R. G., Fink E. A., Auguste D. T. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021;176:113851. DOI: 10.1016/j.addr.2021.113851.
75. Scherphof G. L., Kamps J. A. A. M. The role of hepatocytes in the clearance of liposomes from the blood circulation. *Progress in Lipid Research*. 2001;40(3):149–166. DOI: 10.1016/S0163-7827(00)00020-5.
76. Shi D., Beasock D., Fessler A., Szebeni J., Ljubimova J. Y., Afonin K. A., Dobrovolskaia M. A. To PEGylate or not to PEGylate: Immunological properties of nanomedicine's most popular component, polyethylene glycol and its alternatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2022;180:114079. DOI: 10.1016/j.addr.2021.114079.
77. Xu G., Yang D., He C., Zhong L., Zhu J., Shu Q., Ding H., Xin W., Tong Y., Zhu X., Fang L. Population pharmacokinetics and toxicity correlation analysis of free and liposome-encapsulated doxorubicin in Chinese patients with advanced breast cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2023;92(3):181–192. DOI: 10.1007/s00280-023-04559-y.
78. Yamazoe E., Fang J.-Y., Tahara K. Oral mucus-penetrating PEGylated liposomes to improve drug absorption: Differences in the interaction mechanisms of a mucoadhesive liposome. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;593:120148. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.120148.
79. Haroon H. B., Hunter A. C., Farhangrazi Z. S., Moghimi S. M. A brief history of long circulating nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2022;188:114396. DOI: 10.1016/j.addr.2022.114396.

REFERENCES

1. Osochuk S. S., Kotsur Yu. M., Pozharitskaya O. N., Fli-syuk E. V., Smekhova I. E., Malkov S. D., Zarifi K. O., Titovich I. A., Krasova E. K., Shikov A. N. Liposomes – metabolically active drug transport systems: classification, components, preparation methods, and stabilization. Part 1. *Drug development & registration*. 2024;4. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-4-1867.
2. Bibi S., Kaur R., Henriksen-Lacey M., McNeil S. E., Wilkhu J., Lattmann E., Christensen D., Mohammed A. R., Perrie Y. Microscopy imaging of liposomes: from coverslips to environmental SEM. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;417(1–2):138–150. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.12.021.
3. Nallamotheu R., Wood G. C., Pattillo C. B., Scott R. C., Kiani M. F., Moore B. M., Thoma L. A. A tumor vasculature targeted liposome delivery system for combretastatin A4: Design, characterization, and in vitro evaluation. *AAPS PharmSciTech*. 2006;7(2):E32. DOI: 10.1208/pt070232.
4. Bouvrais H., Pott T., Bagatolli L. A., Ipsen J. H., Méléard P. Impact of membrane-anchored fluorescent probes on the mechanical properties of lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2010;1798(7):1333–1337. DOI: 10.1016/j.bbamem.2010.03.026.
5. Klymchenko A. S., Oncul S., Didier P., Schaub E., Bagatolli L., Duportail G., Mély Y. Visualization of lipid domains in giant unilamellar vesicles using an environment-sensitive membrane probe based on 3-hydroxyflavone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2009;1788(2):495–499. DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.10.019.
6. Mertins O., Dimova R. Insights on the interactions of chitosan with phospholipid vesicles. Part II: membrane stiffening and pore formation. *Langmuir*. 2013;29(47):14552–14559. DOI: 10.1021/la4032199.
7. Ruozzi B., Belletti D., Tombesi A., Tosi G., Bondioli L., Forni F., Vandelli M. A. AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study. *International Journal of Nanomedicine*. 2011;6:557–563. DOI: 10.2147/IJN.S14615.

8. Karakas C. Y., Ustundag C. B., Sahin A., Karadag A. Co-axial electrospinning of liposomal propolis loaded gelatin-zein fibers as a potential wound healing material. *Journal of Applied Polymer Science*. 2023;140(46):e54683. DOI: 10.1002/app.54683.
9. Johnston M. J. W., Edwards K., Karlsson G., Cullis P. R. Influence of drug-to-lipid ratio on drug release properties and liposome integrity in liposomal doxorubicin formulations. *Journal of Liposome Research*. 2008;18(2):145–157. DOI: 10.1080/08982100802129372.
10. Zhigaltsev I. V., Maurer N., Akhong Q.-F., Leone R., Leng E., Wang J., Semple S. C., Cullis P. R. Liposome-encapsulated vincristine, vinblastine and vinorelbine: a comparative study of drug loading and retention. *Journal of Controlled Release*. 2005;104(1):103–111. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.01.010.
11. Damari S. P., Shamrakov D., Varenik M., Koren E., Nativ-Roth E., Barenholz Y., Regev O. Practical aspects in size and morphology characterization of drug-loaded nano-liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;547(1–2):648–655. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.06.037.
12. Kuntsche J., Horst J. C., Bunjes H. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;417(1–2):120–137. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.02.001.
13. Resnik N., Romih R., Kreft M. E., Hudoklin S. Freeze-fracture electron microscopy for extracellular vesicle analysis. *Journal of Visualized Experiments*. 2022;187:e63550. DOI: 10.3791/63550.
14. Perrie Y., Ali H., Kirby D. J., Mohammed A. U. R., McNeil S. E., Vangala A. Environmental scanning electron microscope imaging of vesicle systems. *Methods in Molecular Biology*. 2017;1522:131–143. DOI: 10.1007/978-1-4939-6591-5_11.
15. Takahashi N., Higashi K., Ueda K., Yamamoto K., Moribe K. Determination of nonspherical morphology of doxorubicin-loaded liposomes by atomic force microscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;107(2):717–726. DOI: 10.1016/j.xphs.2017.10.009.
16. Ruozzi B., Tosi G., Leo E., Vandelli M. A. Application of atomic force microscopy to characterize liposomes as drug and gene carriers. *Talanta*. 2007;73(1):12–22. DOI: 10.1016/j.talanta.2007.03.031.
17. Le-Deygen I. M., Skuredina A. A., Kudryashova E. V. Experimental methods to study the mechanisms of interaction of lipid membranes with low-molecular drugs. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2020;46(4):340–359. (In Russ.) DOI: 10.31857/S013234232004017X.
18. Shvetsov I. S. Effect of the pH of the hydrated solution medium on the morphological characteristics of lecithin liposomes. *Modern Science: actual problems of theory and practice. Series of «Natural and technical sciences»*. 2021;(5):236–240. (In Russ.) DOI: 10.37882/2223-2966.2021.05.36.
19. Burdaev N. I., Nikolaeva L. L., Kosenko V. V., Shprakh Z. S., Bunyatyan N. D. Liposomes as drug carriers: classification, preparation methods, and medicinal use. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(2–1):316–332. (In Russ.) DOI: 10.30895/1991-2919-2023-508.
20. Bagatolli L. A. Membranes and Fluorescence Microscopy. *Reviews in Fluorescence*. 2009;33–51. DOI: 10.1007/978-0-387-88722-7_2.
21. Murphy D. B., Davidson M. W. Polarization Microscopy. In: *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2012. P. 153–171. DOI: 10.1002/9781118382905.
22. Murphy D. B., Davidson M. W. Fluorescence Microscopy. In: *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2012. P. 199–231. DOI: 10.1002/9781118382905.ch11.
23. Murphy D. B., Davidson M. W. Confocal Laser Scanning Microscopy. In: *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2012. P. 265–305. DOI: 10.1002/9781118382905.ch13.
24. Henry C. R. Morphology of supported nanoparticles. *Progress in Surface Science*. 2005;80(3–4):92–116. DOI: 10.1016/j.progsurf.2005.09.004.
25. Robson A.-L., Dastoor P. C., Flynn J., Palmer W., Martin A., Smith D. W., Woldu A., Hua S. Advantages and limitations of current imaging techniques for characterizing liposome morphology. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:328115. DOI: 10.3389/fphar.2018.00080.
26. Adler K., Schiemann J. Characterization of liposomes by scanning electron microscopy and the freeze-fracture technique. *Micron and Microscopica Acta*. 1985;16(2):109–113. DOI: 10.1016/0739-6260(85)90039-5.
27. Baxa U. Imaging of liposomes by transmission electron microscopy. *Methods in Molecular Biology*. 2018;1682:73–88. DOI: 10.1007/978-1-4939-7352-1_8.
28. Anabousi S., Laue M., Lehr C.-M., Bakowsky U., Ehrhardt C. Assessing transferrin modification of liposomes by atomic force microscopy and transmission electron microscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005;60(2):295–303. DOI: 10.1016/j.ejpb.2004.12.009.
29. Dürr V., Wohlfart S., Eisenzapf T., Mier W., Fricker G., Uhl P. Oral Delivery of mRNA by Liposomes Functionalized with Cell-Penetrating Peptides. *Applied Nano*. 2023;4(4):293–308. DOI: 10.3390/applnano4040017.
30. Mohammed A. R., Weston N., Coombes A. G. A., Fitzgerald M., Perrie Y. Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004;285(1–2):23–34. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2004.07.010.
31. Sitterberg J., Özçetin A., Ehrhardt C., Bakowsky U. Utilising atomic force microscopy for the characterisation of nanoscale drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010;74(1):2–13. DOI: 10.1016/j.ejpb.2009.09.005.
32. Engelhardt K., Preis E., Bakowsky U. Visualization and characterization of liposomes by atomic force microscopy. In: *Liposomes. Methods and Protocols*. New York: Springer Nature; 2023. P. 253–263. DOI: 10.1007/978-1-0716-2954-3_23.
33. Sheikholeslami B., Lam N. W., Dua K., Haghi M. Exploring the impact of physicochemical properties of liposomal formulations on their in vivo fate. *Life Sciences*. 2022;300:120574. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120574.
34. Paramshetti S., Angolkar M., Talath S., Osmani R. A. M., Spandana A., Al Fatease A., Hani U., Ramesh K. V. R. N. S., Singh E. Unravelling the in vivo dynamics of liposomes: Insights into biodistribution and cellular membrane interactions. *Life Sciences*. 2024;346:122616. DOI: 10.1016/j.lfs.2024.122616.

35. Su J., Lu W., Guo Y., Liu Z., Wang X., Yan H., Zhang R. X. Depot unilamellar liposomes to sustain transscleral drug Co-delivery for ophthalmic infection therapy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2023;86:104629. DOI: 10.1016/j.jddst.2023.104629.
36. Tian H., Chang M., Lyu Y., Dong N., Yu N., Yin T., Zhang Y., He H., Gou J., Tang X. Intramuscular injection of palmitic acid-conjugated Exendin-4 loaded multivesicular liposomes for long-acting and improving *in-situ* stability. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2024;21(1):169–185. DOI: 10.1080/17425247.2024.2305110.
37. Peng J., Wang Q., Sun R., Zhang K., Chen Y., Gong Z. Phospholipids of inhaled liposomes determine the *in vivo* fate and therapeutic effects of salvianolic acid B on idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of Controlled Release*. 2024;371:1–15. DOI: 10.1016/j.jconrel.2024.05.026.
38. Duong V.-A., Nguyen T.-T.-L., Maeng H.-J. Recent advances in intranasal liposomes for drug, gene, and vaccine delivery. *Pharmaceutics*. 2023;15(1):207. DOI: 10.3390/pharmaceutics15010207.
39. Liu J., Zheng A., Peng B., Xu Y., Zhang N. Size-dependent absorption through stratum corneum by drug-loaded liposomes. *Pharmaceutical Research*. 2021;38:1429–1437. DOI: 10.1007/s11095-021-03079-9.
40. Li H., Tang Q., Wang Y., Li M., Wang Y., Zhu H., Geng F., Wu D., Peng L., Zhao G., Zou L., Shi S. Injectable thermosensitive lipo-hydrogels loaded with ropivacaine for prolonging local anesthesia. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022;611:121291. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.121291.
41. Pokharkar V., Patil-Gadhe A., Palla P. Efavirenz loaded nanostructured lipid carrier engineered for brain targeting through intranasal route: *In-vivo* pharmacokinetic and toxicity study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;94:150–164. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.07.067.
42. Xiang Y., Long Y., Yang Q., Zheng C., Cui M., Ci Z., Lv X., Li N., Zhang R. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicity of Baicalin liposome on cerebral ischemia reperfusion injury rats via intranasal administration. *Brain Research*. 2020;1726:146503. DOI: 10.1016/j.brainres.2019.146503.
43. Wei H., Liu T., Jiang N., Zhou K., Yang K., Ning W., Yu Y. A novel delivery system of cyclovirobuxine D for brain targeting: Angiopep-conjugated polysorbate 80-coated liposomes via intranasal administration. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2018;14(7):1252–1262. DOI: 10.1166/jbn.2018.2581.
44. Liu Q., Guan J., Qin L., Zhang X., Mao S. Physicochemical properties affecting the fate of nanoparticles in pulmonary drug delivery. *Drug Discovery Today*. 2020;25(1):150–159. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.09.023.
45. Ferguson L. T., Ma X., Myerson J. W., Wu J., Glassman P. M., Zamora M. E., Hood E. D., Zaleski M., Shen M., Essien E.-O., Shuvaev V. V., Brenner J. S. Mechanisms by which liposomes improve inhaled drug delivery for alveolar diseases. *Advanced NanoBiomed Research*. 2023;3(3):2200106. DOI: 10.1002/anbr.202200106.
46. Lai S., Wei Y., Wu Q., Zhou K., Liu T., Zhang Y., Jiang N., Xiao W., Chen J., Liu Q., Yu Y. Liposomes for effective drug delivery to the ocular posterior chamber. *Journal of Nanobiotechnology*. 2019;17:64. DOI: 10.1186/s12951-019-0498-7.
47. Zhang G., Li X., Huang C., Jiang Y., Su J., Hu Y. Preparation of the Levo-Tetrahydropalmatine Liposome Gel and Its Transdermal Study. *International Journal of Nanomedicine*. 2023;18:4617–4632. DOI: 10.2147/IJN.S422305.
48. Chabru A. S., Salve P. S., Ghumare G. D., Dhamak R. S., Tiwari D. R., Waghmare D. S. Comparative pharmacokinetic studies of transferosomes loaded gel and pressure sensitive adhesive based patch formulation for transdermal delivery of benztropine mesylate. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2024;92:105287. DOI: 10.1016/j.jddst.2023.105287.
49. Yu A.-M., Tu M.-J. Deliver the promise: RNAs as a new class of molecular entities for therapy and vaccination. *Pharmacology & Therapeutics*. 2022;230:107967. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2021.107967.
50. Uhl P., Helm F., Hofhaus G., Brings S., Kaufman C., Leotta K., Urban S., Haberkorn U., Mier W., Fricker G. A liposomal formulation for the oral application of the investigational hepatitis B drug Myrcludex B. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2016;103:159–166. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.03.031.
51. Leal J., Dong T., Taylor A., Siegrist E., Gao F., Smyth H. D. C., Ghosh D. Mucus-penetrating phage-displayed peptides for improved transport across a mucus-like model. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;553(1–2):57–64. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.055.
52. Carlina M. V., Cosman V. M., Pozharitskaya O. N., Shikov A. N., Makarova M. N., Makarov V. G., Balabanyan V. Y. Experimental study of the pharmacokinetics of rifabutin in liposomal form. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2013;(2):37–41. (In Russ.)
53. El-Helaly S. N., Abd Elbary A., Kassem M. A., El-Nabaraawi M. A. Electrosteric stealth Rivastigmine loaded liposomes for brain targeting: preparation, characterization, *ex vivo*, bio-distribution and *in vivo* pharmacokinetic studies. *Drug Delivery*. 2017;24(1):692–700. DOI: 10.1080/10717544.2017.1309476.
54. Rip J., Chen L., Hartman R., van den Heuvel A., Reijerkerk A., van Kregten J., van der Boom B., Appeldoorn C., de Boer M., Maussang D., de Lange E. C. M., Gaillard P. J. Glutathione PEGylated liposomes: pharmacokinetics and delivery of cargo across the blood–brain barrier in rats. *Journal of Drug Targeting*. 2014;22(5):460–467. DOI: 10.3109/1061186X.2014.888070.
55. Dadpour S., Mehrabian A., Arabsalmani M., Mirhadi E., Askarizadeh A., Mashreghi M., Jaafari M. R. The role of size in PEGylated liposomal doxorubicin biodistribution and anti-tumour activity. *IET Nanobiotechnology*. 2022;16(7–8):259–272. DOI: 10.1049/nbt.12094.
56. Guo P., Liu D., Subramanyam K., Wang B., Yang J., Huang J., Auguste D. T., Moses M. A. Nanoparticle elasticity directs tumor uptake. *Nature Communications*. 2018;9(1):130. DOI: 10.1038/s41467-017-02588-9.
57. Krasnici S., Werner A., Eichhorn M. E., Schmitt-Sody M., Pahnernik S. A., Sauer B., Schulze B., Teifel M., Michaelis U., Naujoks K., Dellian M. Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels. *International Journal of Cancer*. 2003;105(4):561–567. DOI: 10.1002/ijc.11108.
58. Wang H.-X., Zuo Z.-Q., Du J.-Z., Wang Y.-C., Sun R., Cao Z.-T., Ye X.-D., Wang J.-L., Leong K. W., Wang J. Surface charge critically affects tumor penetration and the-

- rapeutic efficacy of cancer nanomedicines. *Nano Today*. 2016;11(2):133–144. DOI: 10.1016/j.nantod.2016.04.008.
59. Large D.E., Soucy J.R., Hebert J., Auguste D.T. Advances in receptor-mediated, tumor-targeted drug delivery. *Advanced Therapeutics*. 2019;2(1):1800091. DOI: 10.1002/adtp.201800091.
60. Ishida T., Harashima H., Kiwada H. Liposome clearance. *Bioscience Reports*. 2002;22(2):197–224. DOI: 10.1023/a:1020134521778.
61. Ait-Oudhia S., Mager D.E., Straubinger R.M. Application of pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis to the development of liposomal formulations for oncology. *Pharmaceutics*. 2014;6(1):137–174. DOI: 10.3390/pharmaceutics6010137.
62. Akhter M. H., Ahmad I., Alshahrani M. Y., Al-Harbi A. I., Khalilullah H., Afzal O., Altamimi A. S. A., Najib Ullah S. N. M., Ojha A., Karim S. Drug Delivery Challenges and Current Progress in Nanocarrier-Based Ocular Therapeutic System. *Gels*. 2022;8(2):82. DOI: 10.3390/gels8020082.
63. Tavakoli S., Peynshaert K., Lajunen T., Devoldere J., del Amo E. M., Ruponen M., De Smedt S. C., Remaut K., Urtti A. Ocular barriers to retinal delivery of intravitreal liposomes: Impact of vitreoretinal interface. *Journal of Controlled Release*. 2020;328:952–961. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.10.028.
64. Dhaliwal H. K., Fan Y., Kim J., Amiji M. M. Intranasal delivery and transfection of mRNA therapeutics in the brain using cationic liposomes. *Molecular Pharmaceutics*. 2020; 17(6):1996–2005. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00170.
65. Carter P., Narasimhan B., Wang Q. Biocompatible nanoparticles and vesicular systems in transdermal drug delivery for various skin diseases. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;555:49–62. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.11.032.
66. Matharoo N., Mohd H., Michniak-Kohn B. Transferosomes as a transdermal drug delivery system: Dermal kinetics and recent developments. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2024;16(1):e1918. DOI: 10.1002/wnan.1918.
67. Chen T., He B., Tao J., He Y., Deng H., Wang X., Zheng Y. Application of Förster Resonance Energy Transfer (FRET) technique to elucidate intracellular and In Vivo biofate of nanomedicines. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2019;143:177–205. DOI: 10.1016/j.addr.2019.04.009.
68. Peng T., Xu W., Li Q., Ding Y., Huang Y. Pharmaceutical liposomal delivery—specific considerations of innovation and challenges. *Biomaterials Science*. 2023;11(1):62–75. DOI: 10.1039/D2BM01252A.
69. Allen T.M., Cullis P.R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013;65(1):36–48. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.037.
70. Hume D.A. The mononuclear phagocyte system. *Current Opinion in Immunology*. 2006;18(1):49–53. DOI: 10.1016/j.coi.2005.11.008.
71. Betker J. L., Jones D., Childs C. R., Helm K. M., Terrell K., Nagel M. A., Anchordoquy T. J. Nanoparticle uptake by circulating leukocytes: A major barrier to tumor delivery. *Journal of Controlled Release*. 2018;286:85–93. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.07.031.
72. Giambelluca M., Markova E., Louet C., Steinkjer B., Sundset R., Škalko-Basnet N., Hak S. Liposomes-Human phagocytes interplay in whole blood: effect of liposome design. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2023;54:102712. DOI: 10.1016/j.nano.2023.102712.
73. Mochalova E. N., Egorova E. A., Komarova K. S., Shipunova V. O., Khabibullina N. F., Nikitin P. I., Nikitin M. P. Comparative study of nanoparticle blood circulation after forced clearance of own erythrocytes (mononuclear phagocyte system-cytoblockade) or administration of cytotoxic doxorubicin- or clodronate-loaded liposomes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(13):10623. DOI: 10.3390/ijms241310623.
74. Large D. E., Abdelmessih R. G., Fink E. A., Auguste D. T. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021;176:113851. DOI: 10.1016/j.addr.2021.113851.
75. Scherphof G. L., Kamps J. A. A. M. The role of hepatocytes in the clearance of liposomes from the blood circulation. *Progress in Lipid Research*. 2001;40(3):149–166. DOI: 10.1016/S0163-7827(00)00020-5.
76. Shi D., Beasock D., Fessler A., Szebeni J., Ljubimova J. Y., Afonin K. A., Dobrovolskaia M. A. To PEGylate or not to PEGylate: Immunological properties of nanomedicine's most popular component, polyethylene glycol and its alternatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2022;180:114079. DOI: 10.1016/j.addr.2021.114079.
77. Xu G., Yang D., He C., Zhong L., Zhu J., Shu Q., Ding H., Xin W., Tong Y., Zhu X., Fang L. Population pharmacokinetics and toxicity correlation analysis of free and liposome-encapsulated doxorubicin in Chinese patients with advanced breast cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2023;92(3):181–192. DOI: 10.1007/s00280-023-04559-y.
78. Yamazoe E., Fang J.-Y., Tahara K. Oral mucus-penetrating PEGylated liposomes to improve drug absorption: Differences in the interaction mechanisms of a mucoadhesive liposome. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;593:120148. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.120148.
79. Haroon H. B., Hunter A. C., Farhangrazi Z. S., Moghimi S. M. A brief history of long circulating nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2022;188:114396. DOI: 10.1016/j.addr.2022.114396.