

## Dinamika vezivanja lipozoma holesterola fosfatidilholina za dakronski graft

*U radu je ispitivan uticaj sastava lipozoma na upotrebu grafta kao depoa leka, pošto povezivanje leka sa lipozomima i njegova enkapsulacija produžava proces adsorpcije, ograničava biodistribuciju, smanjuje volumen distribucije i usporava metabolizam leka. U lipozomima je bio enkapsuliran hlorofil. Rezultati su pokazali da je masa grafta prisutnog u in vitro sistemu, čiji lipozomi imaju molarni odnos holesterola i fosfatidilholina 1 : 3, veća od mase grafta čiji su lipozomi izgrađeni od holesterola i fosfatidilholina u molarnom odnosu 1 : 1.*

### Uvod

Cilj bilo kog sistema za dostavljanje leka zasniva se na uvećanju efikasnosti leka i smanjenju njegove toksičnosti, odnosno (1) uvećanju terapijskog uticaja leka sa uvećanjem njegove rastvorljivosti i/ili stabilnosti *in vivo*, (2) smanjenju nepoželjne toksične aktivnosti leka, (3) uvećanju biodostupnosti leka, i (4) obezbeđenju lokalnog oslobađanja leka. Povezivanje lekova sa lipozomima (ili enkapsuliranje u unutrašnjosti/asocijacija sa dvostrukom membranom lipozoma) ima izuzetno značajan efekat u farmakokinetici. Lipozomi povećavaju terapijsku efikasnost različitih supstanci u hemoterapiji; oftamologiji; antimikrobiologiji, uključujući antifugalne, antiviralne i antibakterijske terapije; vakcine; genetske terapije; a imaju i dijagnostičke. U nekim primenama lipozomski nosači imaju ograničenja, kao što su (1) relativno brzo iščezavanje koje pokazuje naglašenu zavisnost od veličine, (2) tendencija da se lokalizuju u tkiva sa mononuklearnim fagocitnim sistemom

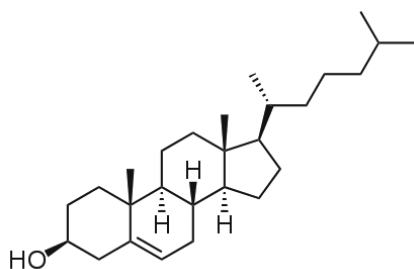
(mononuclear phagocyte system – MPS), posebno u slezini, (3) limitirana tendencija da budu raspoređeni u tkiva koja nisu MPS i (4) njihove farmakinetičke zavisnosti od primenjene doze. Tako se „tradicionalni/klasični lipozomi” eliminišu iz protoka u ćelijama MPS pre efektivnog dostavljanja leka do ekstravaskularnih, a možda i intravaskularnih mesta (Allen *et al.* 1995). U ovom istraživanju korišćena su dva jedinjenja za koje se smatra da su dve glavne lipidne komponente membrane ćelije, holesterol i fosfatidilholin. Strukture ovih jedinjenja prikazane su na slikama 1 i 2.

Dakronski graft je sintetički materijal sa tubularnim oblikom koji zamenjuje krvne sudove. Graft izaziva malo hemijskih reakcija zato što ima slabu reaktivnost (to je zasluga njegove strukture – polietilen tereftalat, PET), a organizam može lako da ga prihvati. Kad se koristi u krvnim sudovima, stvara se novi sloj endotelnih ćelija krvnih sudova iznad grafta. Koristi se u hirurškoj proceduri interpozicije tokom transplantacionih operacija (Aseni *et al.* 2010). U istraživanjima koja se odnose na oslobađanje leka kod metalnih stentova pokrivenih polimerima (polietilen tereftalat, polietilen co-vinil acetat, poli(butilen n-metakrilat)) zapaža se nepostojan rast količine oslobođenog leka izrađenog u procentima (Acharya i Park 2006). Oslobađanje leka iz lipozoma na dakronskom graftu nije ispitivano.

**Cilj** ovog istraživanja je da pokaže da adsorpcija lipozoma na dakronskom graftu zavisi od molarog odnosa holesterola i fosfatidilholina, kao i da utvrdi koji molarni odnos pokazuje najbolje osobine u otpuštanju test-supstance.

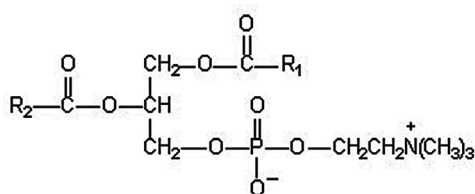
*Bojan Srbinovski (1991), Skopje (Makedonija), Mile Pop Jordanova 31b, učenik 2. razreda SUGS „Georgi Dimitrov” u Skopju*

*MENTOR: Voin Petrović, Institut za nuklearne nauke Vinča*



Slika 1. Struktura holesterola

Figure 1. Cholesterol structure



Slika 2. Struktura fosfatidilholina

Figure 2. Phosphatidilcholine structure

## Materijali i metode

U ovom istraživanju korišćen je dakronski graft (svaki primerak je dužine 6 cm, a širine 3 mm), velikodušni poklon instituta za kardiovaskularne bolesti pri Kliničkom centru Srbije. Holesterol je dobio izolacijom iz svinjskog mozga, metodom po Lajsiću. Fosfatidilholin je izolovan iz jaja (Kidvić *et al.* 1980). Za merenja su korišćeni analitička vagai spektrofotometar Cintra 10 UV/VIS Spectrophotometer, GBC Spectral, Melbourne.

**Dobijanje lipozoma u kojima je enkapsuliran hlorofil.** 20 grama lišća je usitnjeno i zatim homogenizovano u avanu sa tučkom uz upotrebu 50 mL metanola. Smeša se proceduje preko filter papira apsorbancu dobijenog rastvora se meri na tri talasne dužine, 646, 663, 750 nm, pri čemu se za računanje koncentracije hlorofila upotrebljava sledeća jednačina.

$$c_{hl} = [17.76 \cdot (A_{663} - A_{750}) + 734 \cdot (A_{646} - A_{750})] \cdot \frac{V_{uk.}}{V_{uz.}}$$

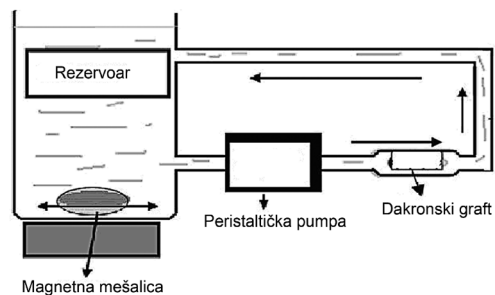
(Pavia *et al.* 1999). Čisti fosfatidilholin nije bio dostupan, pa je zato bio korišćen lecitin (Lec) u čijem sastavu ima 80.5% fosfatidilholina. Računanja su se izvodila na osnovu obezbeđenog odnosa holesterola i fosfatidilholina (tabela 1).

Tabela 1. Molarni odnos holesterola i fosfatidilholina

Odnos $m_{chol} : m_{PC}$	Masa [g]		
	chol	PC	Lec
1 : 1	0.193	0.356	0.443
1 : 1.5	0.193	0.535	0.664
1 : 2	0.193	0.713	0.885
1 : 2.5	0.193	0.891	1.107
1 : 3	0.193	1.070	1.329

Holesterol i lecitin su bili postavljeni u balonu sa okruglim dnom u koji je dodato 50 mL smeše hloroform/metanol (2 : 1). Smeša je bila uparavana nekoliko minuta, a u filmu koji je bio dobijen dodato je 38 mL Tris pufera (koji je titrovao od pH 10 do pH 7.4), zatim je isti balon vorteksovao dok nije dobijena lipidna disperzija. Zatim je smeša bila ostavljena 20 minuta u ultrazvučnom kupatilu. Dobijeni lipozomi su čuvani na hladnom mestu (Kallinteri *et al.* 2002).

U ostalom delu ovog istraživanja ispituju se odnosi 1 : 1 (chol : PC, mol : mol), što je, ustvari, najčešće upotrebljavan tip lipozoma i 1 : 3 (chol : PC, mol : mol) kao odnos koji daje lipozome sa najne-



Slika 3. Šema sistema u koji je postavljen dakronski graft

Figure 3. The system into which the graft was introduced

pravilnijim oblicima, uz pretpostavku da su to lipozomi koji su enkapsulirali hlorofil u najvećim količinama.

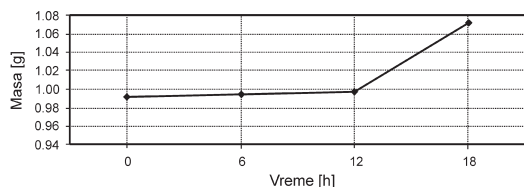
**Opis aparature.** U ovom istraživanju postavljen je in vitro sistem koji omogućava cirkulaciju pufera sa lipozomima i sadrži posebni deo – nosač u kom je postavljen dakronski graft. Sistem je postavljan tako što je 100 mL TBS pufera je stavljeno u čašu. Čaša je povezana sa peristaltičkom pumpom, a jedna od cevi je isečena i dva nastavka automatske pipete su spojena parafilnom, dok dakronski graft stoji unutra. Ovaj deo je postavljen između cevi, nakon čega je započeta cirkulacija. 10 mL lipozoma, koji su prethodno pripremljeni, uključeni su u cirkulaciju koja je trajala 5 minuta. Šema aparature je data na slici 3.

Na kraju, graft je postavljen u epruvetu, dodata je destilovana voda i epruveta se vorteksuje 5 minuta. Dobijena tečnost se pari, a filmu se dodaje petroletar. Ovom rastvoru meri se koncentracija na spektrofotometru.

Dakronski graft koji je postavljen u sistemu sa lipozomima izgrađeni od holesterola i fosfatidilholina u odnosu 1 : 1 (chol : PC mol : mol) označavan je graft 1, a dakronski graft koji je postavljen u sistemu sa lipozomima izgrađeni od holesterola i fosfatidilholin u odnosu 1 : 3 (chol : PC mol : mol) označavan graft 2.

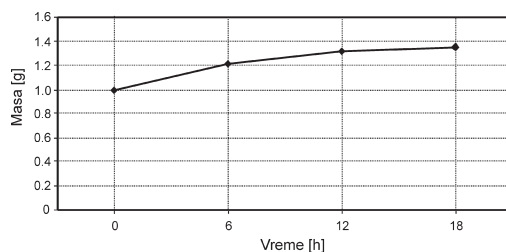
## Rezultati i diskusija

Na mikroskopu je primećeno da su lipozomi različite veličine kad imaju različit odnos konstituenata. Naime, lipozomi koji imaju molarni odnos 1 : 1 (chol : PC, mol : mol) pokazuju pravilnu strukturu multilamelarnih vezikula koji enkapsuliraju hlorofil, ali njihov broj je mali. Lipozomi koji imaju molarni odnos 1 : 1.5 (chol : PC, mol : mol) pokazuju



Slika 4. Grafik zavisnosti promene mase grafta 1 od vremena recirkulacije

Figure 4. Dependence of Graft 1 mass change on the time of recirculation



Slika 5. Grafik zavisnosti promene mase grafta 2 od vremena recirkulacije

Figure 5. Dependence of Graft 2 mass change on the time of recirculation

nepravilnost u strukturi, a njihov broj je veći. Lipozomi sa molarnim odnosom 1 : 2 (chol : PC, mol : mol) su gusti i pravilni, ali ovde se ne primećuju masne kapi i koagulacije neoformljenih lipozoma. Oni koji imaju odnos 1 : 2.5 (chol : PC, mol : mol) su teško vidljivi, dok su lipozomi sa molarnim odnosom 1 : 3 (chol : PC, mol : mol) najtamniji i najnepravilniji. Masa grafta je merena u pravilnim vremenskim intervalima, svakih 6 sati graft je izvlačen iz sistema, postavljen u sušilicu na 45°C i sušen tokom 40 minuta. Osušeni graft je meren na analitičkoj vagi i merena je promena mase. U situaciji kada se koriste lipozomi izgrađeni od holesterola i fosfatidilholina sa molarnim odnosom 1 : 3 (chol : PC, mol : mol), rast mase lipozoma koji se talože na graftu je veći od onog kad su lipozomi izgrađeni od holesterola i fosfatidilholina sa molarnim odnosom 1 : 1 (chol : PC mol : mol).

Takođe, tokom merenja koncentracije hlorofila dobijeno je da lipozomi sa grafta 2 oslobađaju više hlorofila (3.45 µg/mL) nego lipozomi sa grafta 1 (0.68 µg/mL).

## Zaključak

Oba ispitivana slučaja ukazuju na to da lipozomi izgrađeni od holesterola i fosfatidilholina u molarnom odnosu 1 : 3 (chol : PC mol : mol) mogu enkapsulisati veće količine holesterola od tradicionalno korišćenih lipozoma sa molarnim odnosom 1 : 1 (chol : PC mol : mol). Vizuelno se može uočiti da je njihova forma nepravilna. Ovo ukazuje na činjenicu da upotreba lipozoma za terapijske ciljeve može da se obezbedi pacijentima bezbedan

oporavak, čak i u situacijama kad endotelne ćelije pokrivaju površinu grafta suviše sporo. Takođe, prema statističkim računima, masa istih lipozoma koji se talože na dakronski graft se uvećava pravilno. Može se zaključiti da se koncentracija leka održava na konstantnom nivou, te se tako eliminišu komplikacije i mogućnost da se oslobode toksične količine na onom mestu u organizmu gde je postavljen dakronski graft. Moguće je proširiti opseg ovog istraživanja formulisanjem matematičke funkcije koje bi determinisale oslobađanje i adsorpciju leka na dakronskom graftu, kao i pokušajem implantiranja lipozoma izgrađeni od holesterola i fosfatidilholina u molarnom odnosu 1 : 3 u *in vivo* uslovima.

## Literatura

Acharya G., Park K. 2006. Mechanisms of controlled drug release from drug-eluting stents. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **58**: 387.

Allen T. M., Hansen B. C., Lopes de Menezes D. E. 1995. Pharmacokinetics of long-circulating liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **16**: 267.

Aseni P., Lauterio A., Slim O. A., Giacomoni A., Lamperti L., De Carlis L. 2010. Life-Saving Super-Urgent Liver Transplantation with Replacement of Retrohepatic Vena Cava by Dacron Graft. *HPB Surgery*, **2010**: 828326.

Jeon H., McHugh J., Banerjee A., Gedaly R., Johnston T. D., Ranian D. 2008. The use of Dacron graft for cavo-cavostomy in orthotopic liver transplantation. *Transplantation*, **85**: 651.

Kallinteri P., Antimisiaris S. G., Karnabaridis D., Kalogeropoulou C., Tsota I., Siablis D. 2002.

Dexamethasone incorporating liposomes: an *in vitro* study of their applicability as slow releasing delivery systems of dexamethasone from covered metallic stents. *Biomaterials*, **23**: 4819.

Kidvić M., Lajsić S., Petrović Đ. 1980. Praktikum iz hemije prirodnih proizvoda. Beograd: Naučna knjiga

Pavia D. L., Lampman G. M., Kriz G. S., Engel R. G. 1999. *Introduction to Organic Laboratory Techniques: A Microscale Approach, 3rd Edition*. New York: Saunders College Publishing

---

Bojan Srbinovski

## Optimization of Liposome Composition for Drug Delivery and Deposition on Grafts

The effect of liposomal composition in the use of a graft as a drug depot is examined. The liposomes encapsulated chlorophyll, due to the fact that its concentration is easily measured. Connecting the drug with liposome and its encapsulation in them elongates the process of adsorption, limits bio-distribution, decreases distributional volume and decreases the pace of drug metabolism. The results show that the mass of a drug released in an *in vitro* system and encapsulated in liposomes with a molar ratio of cholesterol and phosphatidilcholine 1 : 3 (Chl : PC, mol : mol) is greater than that of a drug encapsulated in liposomes with cholesterol and phosphatidilcholine in the molar ratio of 1 : 1. 