

Fluorimetrijska analiza permeabilnosti lipozomalnih membrana

ALEKSANDRA A. JOVANOVIĆ, Univerzitet u Beogradu,
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd
BOJANA D. BALAN, Univerzitet u Beogradu,
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd
VERICA B. ĐORĐEVIĆ, Univerzitet u Beogradu,
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd
KATARINA P. ŠAVIKIN, Institut za proučavanje lekovitog bilja
„Dr Josif Pančić“, Beograd
VIKTOR A. NEDOVIĆ, Univerzitet u Beogradu,
Poljoprivredni fakultet, Beograd
BRANKO M. BUGARSKI, Univerzitet u Beogradu,
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd
NATAŠA POKLAR ULRIH, Univerzitet u Ljubljani,
Biotehnički fakultet, Ljubljana, Slovenija

Originalni naučni rad

UDC: 577.115

DOI: 10.5937/tehnika1904493J

Prikazana studija daje uvid u promene fluidnosti lipozomalne membrane koje nastaju kao posledica promene strukturnih komponenata lipozoma (dve vrste standardnih fosfolipida - 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoholin, odnosno DPPC i 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoholin, odnosno POPC, jedne vrste komercijalne fosfolipidne smeše - Lipoid H i sterola - holesterol i β -sitosterol), kao i promene udela sterola (0-50 mol %). Fluorimetrijska spektrofotometrija (anizotropija, r) pokazala je da su DPPC lipozomalne membrane bile rigidnije u poređenju sa POPC i Lipoid H lipidnim dvoslojima. Pored toga, povećanje koncentracije sterola prouzrokovalo je smanjenje permeabilnosti membrane u svim lipozomima. Sa druge strane, fosfolipidni dvosloji koji su sadržali β -sitosterol pokazali su veću fluidnost u poređenju sa njihovim paralelama sa holesterolom. Bolja permeabilnost β -sitosterol lipozomalnih membrana, kao i blagotvorni uticaji fitosterola na zdravlje ljudi favorizuju primenu β -sitosterola u pripremi lipozoma kao sastavnih delova prehrambenih, farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda.

Ključne reči: β -sitosterol, lipozomi, permeabilnost, fluorimetrijska spektrofotometrija, holesterol

1. UVOD

Zahvaljujući svom raznovrsnom sastavu i strukturnim karakteristikama, lipozomi predstavljaju predmet istraživanja različitih oblasti medicine, prehrambene, farmaceutske i kozmetičke industrije. Lipozomi su koloidne vezikule sastavljene od lipidne dvoslojne membrane i vodenog jezgra. Lipozomalne membrane se pripremaju upotrebom prirodnih komponenata, poput fosfolipida i sterola [1, 2]. Karakteristike lipozomalnih membrana i njihova buduća primena zavise od fizičko-

hemijskih osobina fosfolipida i sterola korišćenih u njihovoj pripremi [3]. Holesterol je najčešće korišćen sterol u izradi lipozoma, zahvaljujući svojoj sposobnosti da sprečava agregaciju i povećava stabilnost lipozomalne membrane [3, 4]. β -sitosterol pripada grupi biljnih sterola i koristi se kao prirodni antioksidans u namirnicama. Njegova struktura je slična sterolima prisutnim u ćelijama sisara, uz manje izmene u bočnom lancu, poput dodatne etil grupe na položaju C24 u odnosu na holesterol [5]. Lipozomi mogu da budu nosači kako hidrofilnih, tako i lipofilnih aktivnih komponenata, gde se hidrofilne komponente inkapsuliraju unutar vodene faze, a lipofilne unutar fosfolipidnog dvosloja [3, 6]. Cilj ovog istraživanja bilo je ispitivanje permeabilnosti lipozomalnih membrana pripremljenih upotrebom različitih vrsta lipida (dve vrste standardnih fosfolipida - 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoholin,

Adresa autora: Aleksandra Jovanović, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, Kamenogigijeva 4

e-mail: acancarevic@tmf.bg.ac.rs

Rad primljen: 03.06.2019.

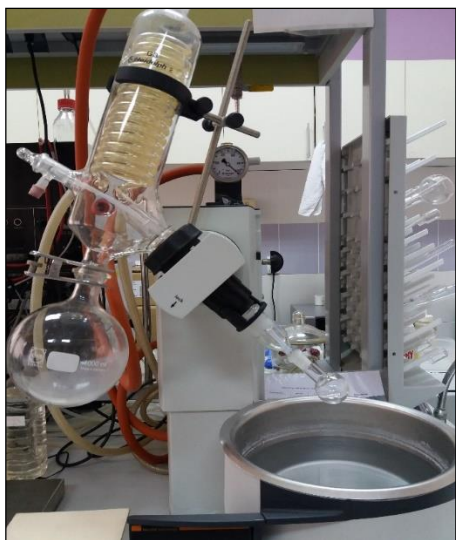
Rad prihvaćen: 14.06.2019.

odnosno DPPC i 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfolipin, odnosno POPC i jedne vrste komercijalne fosfolipidne smeše - Lipoid H), različitih vrsta sterola (holesterola i β -sitosterola) i različitog molskog udela sterola (0-50 mol %), primenom fluorimetrijske spektrofotometrije (meranjem anizotropije, r).

2. EKSPERIMENTALNA PROCEDURA

Materijal - DPPC i POPC (čistoće > 99%, Avanti Polar Lipids, SAD), Lipoid H (komercijalna lipidna smeša, fosfolipidi suncokreta, $\geq 90\%$, Lipoid GmbH, Nemačka); holesterol (čistoće 94%), β -sitosterol iz soje (čistoće $\geq 96\%$), hloroform (čistoće $\geq 99\%$), 2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il]etansulfonska kiselina, odnosno HEPES, kao pufer i 1,6 difenil-1,3,5-heksatrien, odnosno DPH, kao fluorofora kupljeni su od Sigma-Aldrich (SAD), dok je dimetil sulfoksid, odnosno DMSO kupljen od Merck KGaA (Nemačka).

Proces pripreme lipozoma - Multilamelarne vezikule (MLVs) pripremljene su upotrebom dva standardna fosfolipida (DPPC i POPC), jedne komercijalne smeše lipida (Lipoid H) i različitih koncentracija holesterola ili β -sitosterola (5, 10, 20, 30, 40 i 50 mol %), primenom metode tankog filma [7]. Početni rastvori fosfolipida i sterola su pripremljeni rastvaranjem 100 mg lipida ili sterola u 10 mL hloroforma. Pripremljeni su i kontrolni uzorci koji su sadržali samo DPPC, POPC ili Lipoid H. Procedura izrade tankog lipidnog filma je započeta odmeravanjem određenih količina DPPC, POPC ili Lipoid H i holesterol ili β -sitosterol početnih rastvora (u zavisnosti od primenjenih fosfolipida, sterola i različitih fosfolipid/sterol odnosa) u tikvicu okruglog dna. Kontrolni lipozomi koji su sadržali samo čist DPPC, POPC i Lipoid H, bez holesterola ili β -sitosterola pripremljeni su odmeravanjem 0,6 mL čistog rastvora fosfolipida u hloroformu u tikvicu okruglog dna.



Slika 1 - Rotacioni vakuum uparivač

U cilju dobijanja tankog filma hloroform je uparen primenom rotacionog vakuuma uparivača, Hei-VAP Advantage (Heidolph, Nemačka), pod pristiskom od 17 mbar, tokom 3 sata (slika 1).

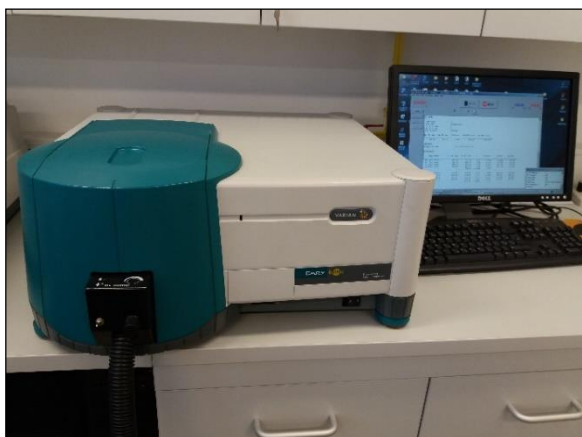
Tanki lipidni film je hidriran HEPES puferom (10 mmol/L) i suspendovan primenom vorteksa i vodenog kupatila (50°C), radi dobijanja MLVs. Finalna koncentracija lipida (fosfolipida i sterola) bila je 2 mg/mL u svim uzorcima. Mali unilamelarni lipozomi (SUVs) formirani su od MLVs, primenom metode soniciranja. Za ovaj dodatni korak korišćeni su ultrazvučni procesor od 20 kHz, Vibracell Ultrasonic (Sonics, SAD) i ultrazvučna sonda sa *on-off* ciklusima u trajanju od 10 s, tokom 30 minuta, pri amplitudi od 40% (slika 2). Sve vreme soniciranja bočica sa uzorkom je bila uronjena u led, kako ne bi došlo do pregrevanja lipozoma.



Slika 2 - Ultrazvučna sonda

Uzorci SUVs su zatim centrifugirani pri 15,000 rpm tokom 60 s u Centric200 (Tehtnica, Slovenija), sa ciljem da se eliminišu sitni ostaci sonde prisutni u lipozomalnoj suspenziji.

Fluorimetrijska spektrofotometrija - Fluorimetrijska analiza (merenje anizotropije, r) izvedena je primenom fluorimetrijskog spektrofotometra Carry Eclipse (Varian, Austrija) u kivetama dužine 10 mm (slika 3). Prvo je dodato 125 μ L SUVs u HEPES pufer radi dostizanja finalne koncentracije lipida od 0,1 mg/mL. Zatim je 2,5 μ L fluorofore DPH (1 mM rastvor u DMSO) pomešan sa lipozomalnom suspenzijom i vrednosti anizotropije (r) su merene u temperaturnom opsegu od 20 do 60°C, uz povećanje temperature za 5°C za svako merenje, u trajanju od 7 minuta. DPH fluorescentna anizotropija je merena na ekscitatornoj talasnoj dužini od 358 nm i emisionoj talasnoj dužini od 410 nm. Vrednosti G-faktora (odnos osetljivosti sistema detekcije za vertikalnu i horizontalnu polarizacionu svetlost) određene su za svaki uzorak.



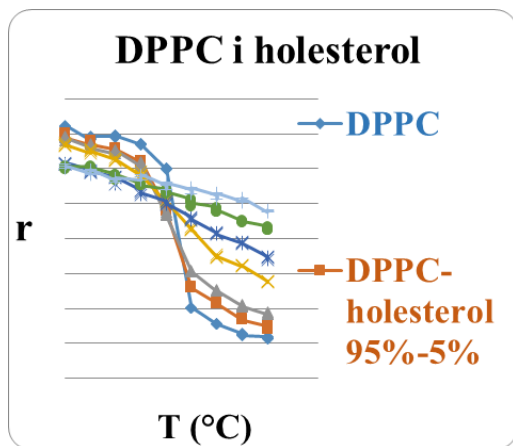
Slika 3 - Fluorimetrijski spektrofotometar

Statistička analiza - U prikazanoj studiji sva merenja i analize izvedene su u tri ponavljanja. Statistička analiza izvršena je korišćenjem statističkog softvera *STATISTICA 7.0*. Statistička značajnost je određena primenom analize varijanse (*one-way ANOVA*) i Dankanovog testa. Razlike su smatrane statistički značajnim pri $p < 0,05$.

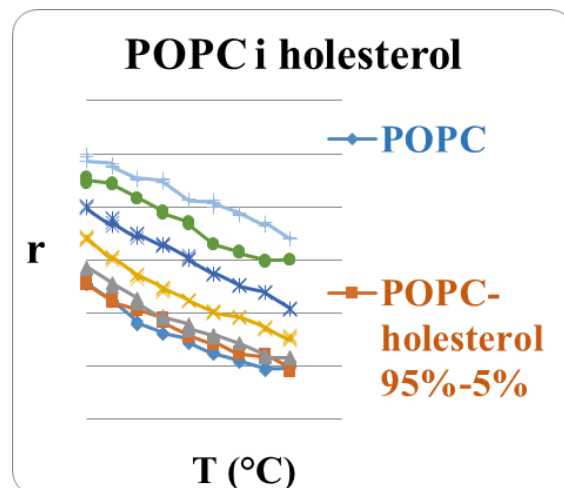
3. REZULTATI I DISKUSIJA

Fluorimetrijska spektrofotometrija i DPH, kao nepolarna fluorofora, korišćeni su za određivanje anizotropije (r) lipozoma pripremljenih korišćenjem tri vrste fosfolipida (DPPC, POPC i Lipoid H) i dva sterola (holesterol i β -sitosterol). Anizotropija fluorofore DPH ukazuje na promenu fluidnosti lipidnog dvosloja u hidrofobnom jezgru lipozomalne membrane [8]. Uticaji tri različita tipa fosfolipida i različitih sadržaja holesterola i β -sitosterola (0-50 mol %) na permeabilnost membrane, u temperaturnom opsegu od 20 do 60°C, prikazani su na slikama 4A-C za holesterol i na slikama 5A-C za β -sitosterol.

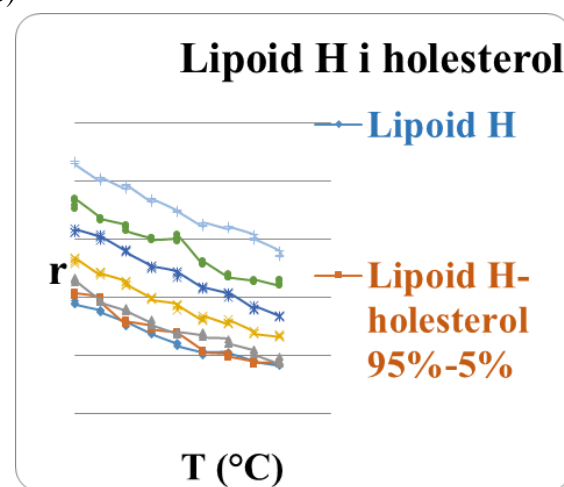
Prikazani rezultati ukazuju na pad u vrednostima anizotropije (povećanje fluidnosti membrane) sa povećanjem temperature do 60°C, u svim uzorcima lipozoma.



A)



B)



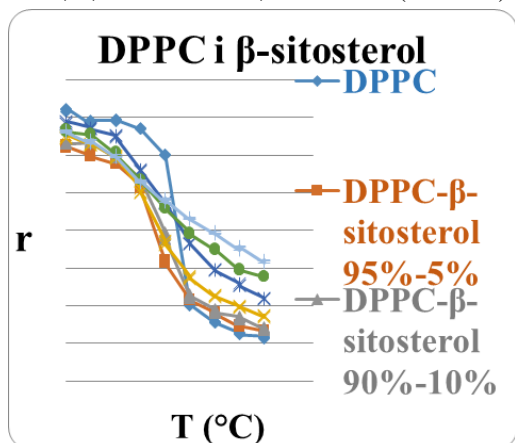
C)

Slika 4 - Fluorescentna anizotropija (r) DPH fluorofore dodate DPPC (A), POPC (B) i Lipoid H (C) lipozomima sa različitim udelom holesterola (0-50 mol %) na različitim temperaturama (20-60°C)

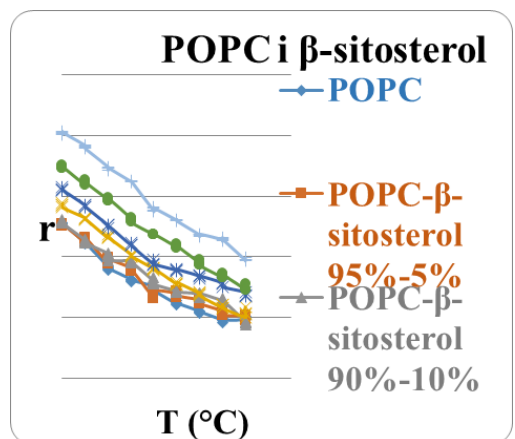
Dobijeni rezultati su bili očekivani zato što povišena temperatura uzrokuje povećanje mobilnosti lipida, te posledično povećanje permeabilnosti dvoslojne membrane [9]. Za svaki tip fosfolipida vrednost fluorescentne anizotropije je viša u gel fazi, pri čemu dolazi do pada vrednosti nakon dostizanja temperature faznog prelaza (T_m , prelazak iz gel faze u tečno-kristalnu fazu).

Utvrđeno je da početna vrednost anizotropije za čiste DPPC lipozome iznosila 0,36 na 20°C, dok je pri temperaturi od 60°C vrednost opala na 0,06 (slika 4A). Dodatno, primetan je značajan pad vrednosti anizotropije između 40 i 45°C (0,30 i 0,10), što je u skladu sa ranijim rezultatima dobijenim analizom termičkih karakteristika DPPC lipozoma, pri čemu se fazni prelaz pojavio na 42,3°C. Time se može objasniti „S oblik“ krive čistih DPPC lipozoma. Izmerena vrednost

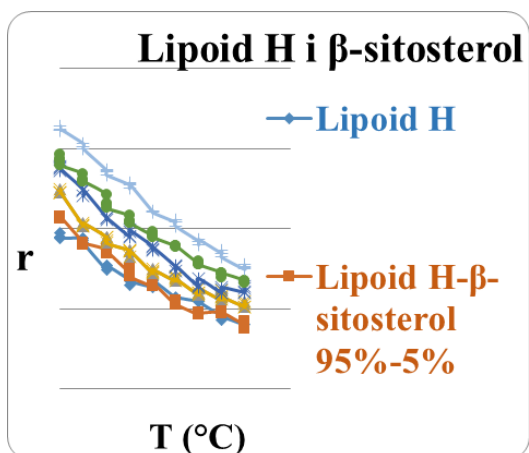
anizotropije čistih POPC lipozoma iznosila je 0,13 pri temperaturi od 20°C i smanjena je na 0,05 pri 60°C (slika 4B). Dobijena vrednost anizotropije za čiste Lipoid H lipozome bila je slična vrednostima za POPC lipozome, 0,09 na 20°C i 0,05 na 60°C (slika 4C)..



A)



B)



C)

Slika 5 - Fluorescentna anizotropija (r) DPH fluorofore dodate DPPC (A), POPC (B) i Lipoid H (C) lipozomima sa različitim udelom β -sitosterola (0-50 mol %) na različitim temperaturama (20-60°C)

Pored toga, sličan trend (smanjenje vrednosti anizotropije sa povećanjem temperature) primećen je za sve lipozome koji sadrže različite količine holesterola ili β -sitosterola. Međutim, vrednosti anizotropije čistih POPC i Lipoid H lipozoma bile su statistički značajno niže u poređenju sa DPPC lipozomima ($p < 0,05$). Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima, jer je pokazano da DPPC formira homogeni i rigidni lipidni dvosloj, sa pravilnim rasporedom ugljovodoničnih lanaca, dok mešavina različitih fosfolipida (kao što je slučaj sa Lipoid H komercijalnom smešom) stvara manje homogenu lipozomalnu membranu, za koju je karakteristična veća permeabilnost [9, 10]

Rezultati dobijeni prilikom analize lipozoma sa sterolima (holesterol i β -sitosterol) pokazuju da ispod vrednosti T_m čistog DPPC, dodavanje holesterola i β -sitosterola rezultira smanjenjem anizotropije DPH, u poređenju sa čistim DPPC lipozomima (slike 4A i 5A). Međutim, iznad ove temperature, lipozomi sa sterolima su dali više vrednosti anizotropije nego sam DPPC. To svedoči o ograničenom kretanju fluorofore DPH, kao i o većoj urednosti dvoslojne strukture u DPPC-sterol sistemu pri višim temperaturama.

Prikazani rezultati su u skladu sa literaturnim podacima, gde su u gel fazi steroli doveli do promena u organizaciji fosfolipidnih lanaca i time olakšali mobilnost molekula u DPPC dvosloju, dok su u tečno-kristalnoj fazi steroli dali više uređenu lipozomalnu membranu [5, 10, 11]. Uticaj temperature na anizotropiju DPH (povećanje kretanja DPH uz zagrevanje) je izraženiji kako je koncentracija sterola niža. Dodavanje sterola snažno utiče na termička svojstva lipozoma, što dovodi do promena u permeabilnosti membrane [9]. Pri koncentraciji iznad 20 mol % steroli prouzrokuju širenje temperaturnog opsega u kome dolazi do faznog prelaska.

Prema prikazanim rezultatima, u slučaju DPPC lipozoma na temperaturama ispod temperature faznog prelaza, nije bilo statistički značajnih razlika između različitih sadržaja sterola, dok je pri višim temperaturama vrednost anizotropije značajno povećana sa povećanjem sadržaja sterola, što svedoči o smanjenju fluidnosti lipidnog dvosloja. Moguće je da pri niskim temperaturama DPPC membrana pokazuje značajnu rigidnost što sprečava efikasnu ugradnju sterola u dvosloj, dok pri višim temperaturama to nije bio slučaj. Što se tiče uticaja udela sterola u POPC i Lipoid H lipozomima, krive na slikama 4B, 4C, 5B i 5C pokazuju promene u vrednostima anizotropije proporcionalne promenama u sadržaju sterola, kao rezultat pravilnijeg pakovanja lipida u dvosloju i smanjene pokretljivosti ugljovodoničnih lanaca fosfolipida izazvanih prisustvom sterola. Nekoliko istraživanja je pokazalo da prisustvo holesterola u lipozomalnoj membrani doprinosi povećanju kohezije i mehaničke

rigidnosti dvosloja, te snižavanju permeabilnosti membrane, kako u POPC lipozomima, tako i u lipozomima sa drugim vrstama fosfolipida [9,10]. Kada se analiziraju lipozomi sa holesterolom u odnosu na paralele sa β -sitosterolom, DPPC lipozomi koji sadrže β -sitosterol pokazuju niže vrednosti anizotropije, naročito na višim temperaturama i iznad 20 mol % udela sterola. Slično tome, sve POPC i Lipoid H lipozomalne membrane koje sadrže β -sitosterol su pokazale veću fluidnost nego membrane sa istim udelom holesterola pri istoj temperaturi. To govori da β -sitosterol manje utiče na rigidnu organizaciju fosfolipidnih lanaca u tečno-kristalnoj fazi, u poređenju sa holesterolom. Naime, β -sitosterol u odnosu na holesterol ima dodatnu etil grupu, zbog čega stvara manje uređeno okruženje u fosfolipidnom dvosloju. Prema literaturi, stigmasterol, β -sitosterol i ergosterol, kao fitosteroli predstavljaju komponente koje su više efikasne u smanjenju rigidnosti lipidne membrane, u poređenju sa holesterolom i 7-dehidroholesterolom [11, 12]. Sa druge strane, velika količina holesterola može izazvati kristalizaciju lanaca fosfolipida i taj fenomen ima destabilizujući efekat na nivou formulacije lipozoma [2, 10]. U poređenju sa tim, formiranje kristala nije uočeno u lipozomima sa β -sitosterolom, koji je rastvorljiviji od lipida i manje planaran od holesterola, te je stoga mogao efektivnije da deluje u reorganizaciji lanaca fosfolipidnog dvosloja [12].

4. ZAKLJUČAK

U prikazanoj studiji ispitan je uticaj tri različita tipa fosfolipida (DPPC, POPC i Lipoid H), dve vrste sterola (holesterol i β -sitosterol) i različitog udela sterola (0-50 mol %) na permeabilnost lipozomalne membrane. DPPC je dao rigidnije fosfolipidne dvosloje, u poređenju sa POPC i Lipoid H fosfolipidima, dok je povećanje sadržaja holesterola ili β -sitosterola dovelo do povećane rigidnosti membrane u svim lipozomima. Pored toga, fosfolipidni dvosloji koji su sadržali β -sitosterol bili su fluidniji, u poređenju sa lipozomalnim membranama sa holesterolom, zahvaljujući efikasnosti β -sitosterola u reorganizaciji fosfolipidnih lanaca. Bolja permeabilnost β -sitosterol lipidnih dvosloja, kao i blagotvorni uticaji biljnih sterola na zdravlje ljudi daju prednost primeni β -sitosterola (nad holesterolom) u pripremi lipozoma koji mogu da se koriste u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

5. ZAHVALNICA

Ovaj rad predstavlja rezultat projekta III46010 i bilateralnog projekta između Srbije i Slovenije pod nazivom „Lipozomi obloženi biopolimerima kao novi sistemi za dostavu prirodnih fenolnih komponenata”, finansiranih od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

- [1] Evans K, Compton D, Whitman N, Laszlo J, Apell M, Vermillion K, Kim S. Octadecyl ferulate behavior in 1,2-Dioleoylphosphocholine liposomes, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Vol. 153, pp. 333-343, 2016.
- [2] Tan C, Xue J, Lou X, Abbas S, Guan Y, Feng B, Zhang X, Xia S, Liposomes as delivery systems for carotenoids: comparative studies of loading ability, storage stability and in vitro release, *Food & Function*, Vol. 5, pp. 1232-1240, 2014.
- [3] Laouini A, Charcosset C, Fessi H, Holdich R. G, Vladislavljević G. T, Preparation of liposomes: A novel application of microengineered membranes—From laboratory scale to large scale, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 112, pp. 272-278, 2013.
- [4] Liu W, Wei F, Ye A, Tian M, Han J, Kinetic stability and membrane structure of liposomes during in vitro infant intestinal digestion: Effect of cholesterol and lactoferrin, *Food Chemistry*, Vol. 230, pp. 6-13, 2017.
- [5] Zhao L, Temelli F, Curtis J, Chen L, Preparation of liposomes using supercritical carbon dioxide technology: Effects of phospholipids and sterols, *Food Research International*, Vol. 77, pp. 63-72, 2015.
- [6] Pimentel-Moral S, Teixeira M. C, Fernandes A. R, Arráez-Román D, Martínez-Férez A, Segura-Carretero A, Souto E. B, Lipid nanocarriers for the loading of polyphenols – A comprehensive review, *Advances in Colloid and Interface Science*, Vol. 260, pp. 85-94, 2018.
- [7] Al-Zubaidi A, Al-Rubaie M. S, Abdullah T. S, Multi Lamellar Vesicles (MLVs) liposomes preparation by thin film hydration technique, *Engineering and Technology Journal*, Vol. 32, pp. 550-560, 2013.
- [8] Jovanović A, Balanč B, Ota A, Ahlin Grabnar P, Djordjević V, Šavikin K, Bugarski B, Nedović V, Poklar Ulrih N, Comparative Effects of Cholesterol and β -Sitosterol on the Liposome Membrane Characteristics. *European Journal of Lipid Science and Technology*, Vol. 120, pp. 1-11, 2018.
- [9] Balanč B, Ota A, Đorđević V, Šentjurs M, Nedović V, Bugarski B, Poklar Ulrih N, Resveratrol-loaded liposomes: Interaction of resveratrol with phospholipids, *European Journal of Lipid Science and Technology*, Vol. 117, pp. 1615-1626, 2015.
- [10] Thewalt J. L, Bloom M, Phosphatidylcholine: cholesterol phase diagrams, *Biophysical Journal*, Vol. 63, pp. 1176-1181, 1992.

- [11]Farkas E, Schubert R, Zelko R. Effect of β -sitosterol on the characteristics of vesicular gels containing chlorhexidine. *International Journal of Pharmaceutics*; Vol. 278, pp. 63-70, 2004.
- [12]Demel R, Kruffy B. The functions of sterols in membrane, *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, Vol. 457, pp. 109-132, 1976.

SUMMARY

FLUORESCENCE ANALYSIS OF LIPOSOMAL MEMBRANES PERMEABILITY

The present study provides insight into changes in the liposomal membrane fluidity as a result of variation of structural components (two types of standard phospholipids - 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine, i.e. DPPC and 1-palmitoyl-2-oleoyl-glycerol-3-phosphocholine, i.e. POPC, one type of phospholipid mixture - Lipoid H and sterols - cholesterol and β -sitosterol), as well as variation in sterol concentration (5-50%). Fluorescence spectroscopy (anisotropy, r) has shown that DPPC liposomal membranes were more rigid compared to POPC and Lipoid H lipid bilayers. Furthermore, the increment of sterol concentration has caused a decrease in the membrane fluidity in all liposomal samples. On the other hand, phospholipid bilayers containing β -sitosterol has possessed better fluidity in comparison to their cholesterol parallels. Higher permeability of β -sitosterol liposomal membranes, as well as the beneficial effects of phytosterol on human health, favor the use of β -sitosterol in the preparation of liposomes as components of food, pharmaceutical and cosmetic products.

Key words: *β -sitosterol, liposomes, permeability, fluorescence spectroscopy, cholesterol*