

Биологийн идэвхтэй нэгдлийг липосом ашиглан зөөвөрлөх боломж

Цэдэвсүрэнгийн Болорцэцэг¹, Санждоржийн Энхмарт², Бямбажавын Билгүүн², Дарьсүрэнгийн Марал-Эрдэнэ², Тулгаагийн Энх-Оюун², Бүрэнжаргалын Мөнхжаргал¹, Даваанямын Будрагчаа^{2*}

¹Химийн тэнхим, Шинжлэх ухааны сургууль, Монгол Улсын их сургууль, Залуучуудын өргөн чөлөө 1, 14200, Улаанбаатар хот

²Бодис солилцоо, биохимийн лаборатори, Мал эмнэлгийн хүрээлэн, Хөдөө аж ахуйн их сургууль, Зайсан 17029, Улаанбаатар хот

*Холбоо баригч зохиогч: d.budragchaa@gmail.com

 <https://orcid.org/0000-0001-9418-8064>

Хүлээн авсан: 03.02.2022

Хянасан: 26.05.2022

Хэвлэлтэд орсон: 15.06.2022

Хураангуй

Липосомыг био-идэвхит нэгдлийн зөөвөрлөгч болгон ашиглах судалгаа өргөнөөр хийгдэж, шахмал эмийн үйлчлэх идэвх 20%, тарилга 70%-ийн идэвхтэй байдаг бол липосомоор зөөвөрлөгдсөн тэдгээр нэгдлийн бай эсэд хүрч очин 80-аас дээш хувийн идэвх үзүүлдэг байна. Бид энэхүү судалгаагаар липосом ашиглан тосон суурьт болон усанд уусдаггүй биологийн идэвхтэй нэгдлүүдийг зөөвөрлөх боломжийг судаллаа. Ингэснээр хүн эмнэлгийн анагаах ухаанд нэвтрээд буй липосом ашиглах аргыг мал эмнэлгийн хэрэглээнд нэвтрүүлэх боломж нээгдэх юм.

Туршилтанд 0.5 мл 5%-ын кали-иодын тос ашиглан липосомоор зөөвөрлөх туршилтыг явуулахад уусмал нэгэн жигд хөөсөрсөн бол 0.3 г куркумин хуурай бодисны хувьд тунадас бага үүсгэж байсан нь липосомоор зөөвөрлөгдөх боломжтойг харуулж байна. Бүтцийн анализ хийсэн FT-IR спектрофотометрийн үр дүнд 3400 см⁻¹ утганд –ОН групп, 2973 см⁻¹ утганд С-Н, 1730 см⁻¹ утганд С=О, 1220 см⁻¹ утганд С-О тосны хүчлийн функциональ бүлгүүд илэрсэн. Электрон микроскопын 500 нм хэмжилтэд фосфолипид бөмбөлөг үүссэн нь липосом мөн болохыг илтгэж байна. Масс спектрийн хийн хроматографийн (GC/MS) аргаар ханасан болон ханаагүй тосны хүчлийн харьцааг тодорхойлоход цагаан өндгөнд 60.44% ба 37.91%, бор өндгөнд 39.41% ба 62.02% тус тус байв. Таньцын туршилтаар биологийн идэвхит нэгдлийг тээвэрлэх боломжтой нь тогтоогдлоо.

Түлхүүр үг: Өндөгний шар, фосфолипид, липосом, тосон суурьт нэгдэл, куркумин

Оршил

Липосомыг анагаах ухаан [1], гоо сайхан [2], хүнсний нэмэлт бэлдмэл гарган авах [3] зэрэг салбарт ашиглах боломжтой бөгөөд сүүлийн жилүүдэд энэ чиглэлийн судалгааны ажлууд өргөн хүрээтэйгээр эрчимтэй хийгдэж байна. Судлаач Bangham ба бусад нар [4] электрон микроскопын хөгжүүлэлт хийж байхдаа липосомыг анх 1965 онд нээсэн байдаг. Уураг зөөвөрлөсөн липосом ашиглан өвчлүүлсэн цагаан хулганыг эмчлэх туршилтыг 1972 онд [5] анх удаа амжилттай хэрэгжүүлсэн байна. Мөн *in vivo* орчинд анхны мэдээ алдуулах бодисыг липосомоор зөөвөрлөх боломжтой болохыг 1990 онд [5] тогтоож, липосом дээр суурилсан хөхний хорт хавдрын эсрэг эмийн бэлдмэлийг 2002 онд [6] гарган авчээ.

Тосон суурьт нэгдлүүд, липо-уураг, липо-нүүрсус, фермент, гормонуудыг усан суурьт нэгдэл болгон хувиргах, липосомтой холбосон эмийн нэгдэл гарган авах зэрэг судалгааны ажлуудыг манай орны хувьд хэрэгжүүлэх нь чухал байна. Фосфолипидыг өндөгний шар болон холестеролоос ялгахад триацилглицерин, этанолыг тус тус ашигладаг байна [3].

Бид энэхүү судалгаагаар өндөгний шараас фосфолипид ялган авч цэвэршүүлж, липосомыг бэлтгэн улмаар тосон суурьт болон усанд уусдаггүй нэгдлүүдийг усан суурьт нэгдэл болгон хувиргах, эмийн зөөвөрлөлтөд липосомийг ашиглах боломжийг судаллаа.

Материал, арга зүй

Худалдаанд буй бор болон цагаан өндөгний Gladkowski [7-10] нарын арга зүйг мөрдлөг болгон шар хэсгээс фосфолипид ялган авав. Тосон болон хуурай хэлбэртэй зөөвөрлөгдөх бодисын липосомд холбогдох идэвхийг судлахдаа GE healthcare [10] арга зүйн дагуу хийж гүйцэтгэлээ.

Ялган авсан фосфолипидийн бүтцийн анализыг FT-IR спектрофотометр, нанобүтцийг электрон микроскопоор тус тус баталгаажуулав. Бэлтгэсэн липосомын фракцын ханасан болон ханаагүй тосны хүчил, тосны хүчлийн найрлагыг масс спектр детектортэй хийн хроматографийн (GC/MS) аргаар тодорхойлов.

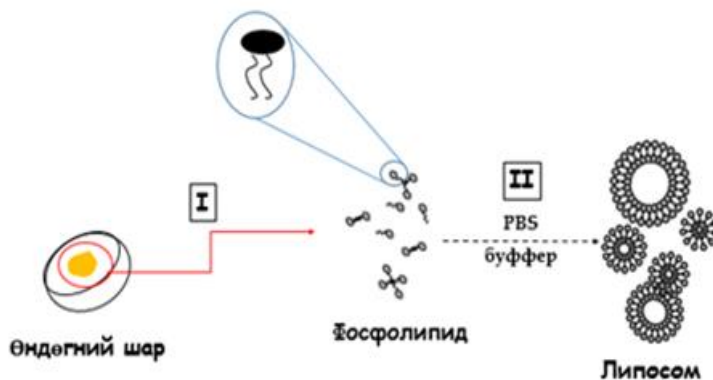


Figure 1. Extraction of phospholipid-rich fraction from egg yolk

Фосфолипидийг ялгах, липосом үүсгэх

Цагаан болон бор тус бүр 7 ширхэг өндөг сонгон авч, өндөгний шарыг жинлэн хэмжинэ. Өндөгний шарыг 100 мл ацетонтой соронзон холигчоор 30 минут турш сайтар хольж, 3000 грт хурдтайгаар 9 минут турш центрифугдэж, тунадасыг дахин ацетоноор угааж цэвэршүүлнэ. Уусмалыг вакуум нэрэгч багажаар нэрж өтгөрүүлэн

хлороформ:этанол-ын 4:1 болон 4:2 харьцаатай органик уусмалд уусган фосфолипидийн фракцийг ялган авна. Фосфолипидийг хлороформд уусган шүүж, цэвэршүүлэн нэрж өтгөрүүлнэ. Фосфолипид агуулсан дээжинд буфферийн уусмал хийж туйлт орчинг өөрчлөн липосом үүсгэнэ.

Тосон суурьт болон усанд уусдаггүй нэгдлийг усан суурьт болгон хувиргах

Тосон суурьт нэгдэл болгон 5%-ийн кали иодын тосон уусмал, усанд уусдаггүй нэгдэл болгон куркуминыг тус тус сонгон судалгаанд ашиглав. Нэрж өтгөрүүлсэн фосфолипидын дээжинд 0.5 мл кали иод, 0.3 г куркумин тус тус хэмжин хийж, 50 мл буфферийн уусмал хийн соронзон холигч дээр 1 цагийн турш

хутгана. Липосомд тосон суурьт болон усанд уусдаггүй нэгдэл холбогдсон болохыг хуруу шилний гадаргуу болон ёроолд үүсэх тунадасыг хяналттай харьцуулан тооцно. Фосфолипид агуулаагүй буфферийн уусмалыг хяналт болгож туршина.

Үр дүн

Дээр дурьдсан арга зүйн дагуу өндөгний шар хэсгээс фосфолипидыг ялгах, цэвэршүүлэхэд цагаан өндөгний шараас фосфолипидийн

фракц 5,6 г буюу 42,53%, бор өндөгнөөс 7,4 г буюу 50,7% тус тус гарцтай байв.

Нил улаан туяаны спектрометрээр бүтцийн тайлал хийсэн дүн

Ялган авсан фосфолипидийн дээжинд бүтцийн анализыг нил цлаан туяаны спектрометрээр явуулахад тосны хүчлийн

функциональ групп 3400 см^{-1} утганд -ОН бүлэг, 2973 см^{-1} утганд C-H, 1730 см^{-1} утганд

C=O, 1220 cm^{-1} утганд C-O бүлгүүд тус тус илэрч байв.

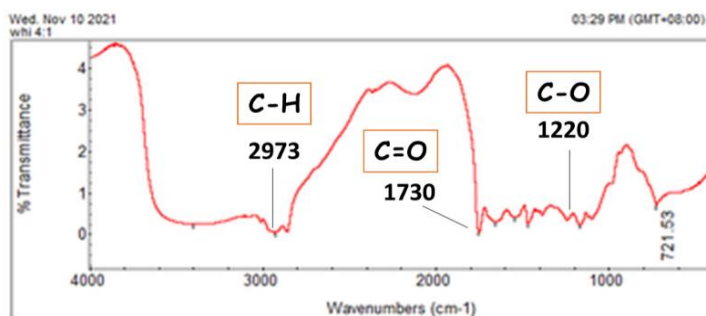


Figure 2. Structure analysis of Phospholipids

Электрон микроскоптой хосолсон энергийн дисперсийн рентген флуоресценц (SEM-EDS)-ээр нанобүтцийг хэмжсэн дүн

Ялган авсан фосфолипидийг хлороформд уусган -20°C -д хөлдөөж, гэсгээх үйлдлийг 3-аас 5 удаагийн давтамжтай явуулж, вакуум нэрэгч багажаар нэрж өтгөрүүлсэн. Улмаар нэрсэн дээжийг фосфат бамбайн буффер ашиглан липосом бий болгох туршилтыг соронзон холигч дээр 1 цагийн турш явуулж,

липосомыг гарган авсан. Липосом агуулсан дээжийг электрон микроскоп ашиглан 100 нм-т бүтцийн шинжилгээ явуулсныг зураг 3-аар харуулав.



Figure 3. Structure of Liposome

Тосон суурьт болон усанд уусдаггүй нэгдлийг усан суурьт болгон хувиргах туршилтын дүн
Цэвэршүүлсэн фосфолипидийн дээжид 0.5 мл 5%-ын кали-иодын тосон бодис нэмж, 50 мл фосфат бамбайн буффер нэмэн туйлт орчинг өөрчлөн липосом үүсгэх үед тосон суурьт нэгдлийг гидрофил давхаргад нэвтрэх таньцын туршилт явуулав.

Харин усанд уусдаггүй нэгдэл болох куркуминаас 0.3 г хэмжин авч, нэрж өтгөрүүлсэн фосфолипид агуулсан дээжинд

хийж, 50 мл фосфат бамбайн буффер нэмэн туйлт орчинг үүсгэн дээрх туршилтын адил явуулав.

Хяналт болгож фосфолипид агуулаагүй фосфат бамбайн буффер ашиглан 0.5 мл 5%-ын кали-иодын тос, 0.3 г куркумин холиод соронзон холигч ашиглан явуулав.

Туршилтын үр дүнг зураг 4 болон 5-д үзүүлэв.

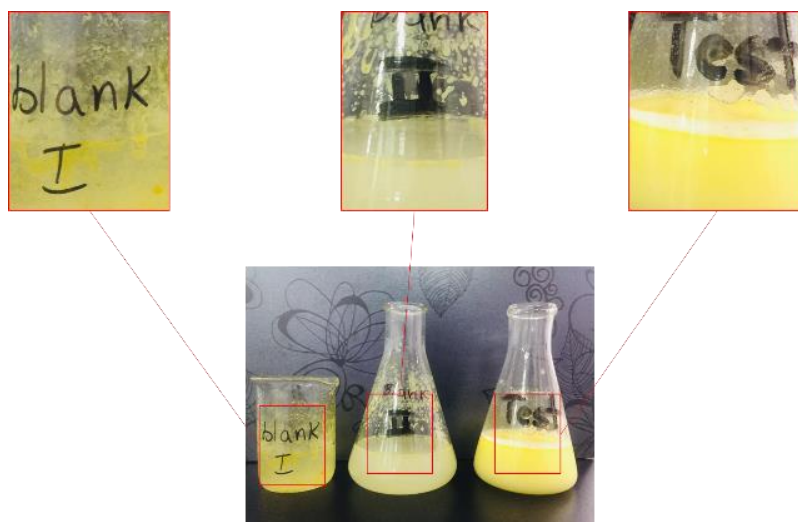


Figure 4. Interaction between oil-based compounds with liposome

Зураг 4 дээр хяналт (blank I, II) болгон авсан туршилтын шилны гадаргуу дээр тосон мөхлөг ихээр үүссэн бол туршилт (test)-ын шилний гадаргуу хөөсөрсөн нэгэн жигд

байгаа нь липосомтой харилцан үйлчлэлд орсонг харуулж байна.

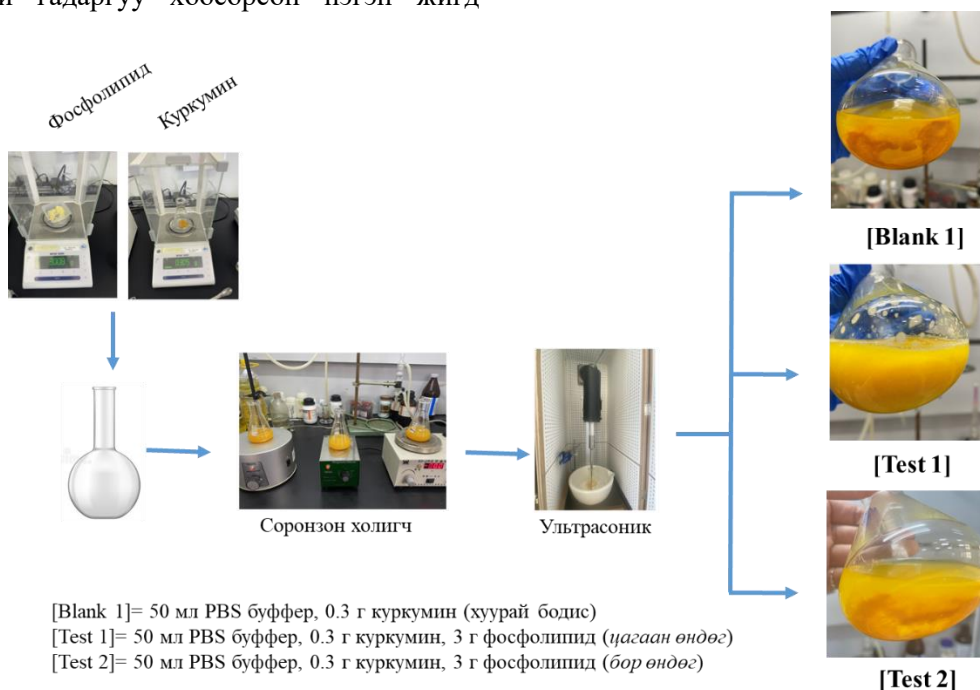


Figure 5. Interaction between water-insoluble compounds with liposome

[Blank]=50 ml PBS and 0.3 gr Curcumin (dry compound)

[Test 1]= 50 ml PBS and 0.3 gr Curcumin, 3 gr phospholipid (white egg)

[Test 1]= 50 ml PBS and 0.3 gr Curcumin, 3 gr phospholipid (brown egg)

Зураг 5-аар туршилт 1 болон 2-ын үүсэх тунадасыг харьцуулан харвал цагаан өндөгнөөс гаралтай фосфолипид ашиглан бий болгосон липосомтой куркумин

харилцан үйлчлэлд орж, бага зэргийн тунадас үүсгэсэн болох нь харагдаж байна.

Масс спектр детектортэй хийн хроматограф (GC/MS)-аар тодорхойлсон дүн

Ханасан болон ханаагүй тосны хүчлийн харьцаа цагаан өндгөнөөс ялгасан дээжинд 60.44% болон 37.91% байсан бол бор өндгөнд 39.41% болон 62.02% байв. Фосфолипид (POPC)-ийн үндсэн тосны хүчил болох

палмитин (*Palmitic acid*)-ы хүчил 26.94%, олеины хүчил (*Oleic acid*) 11.77% цагаан өндгөнд агуулагдаж байгааг тус тус тодорхойлов.

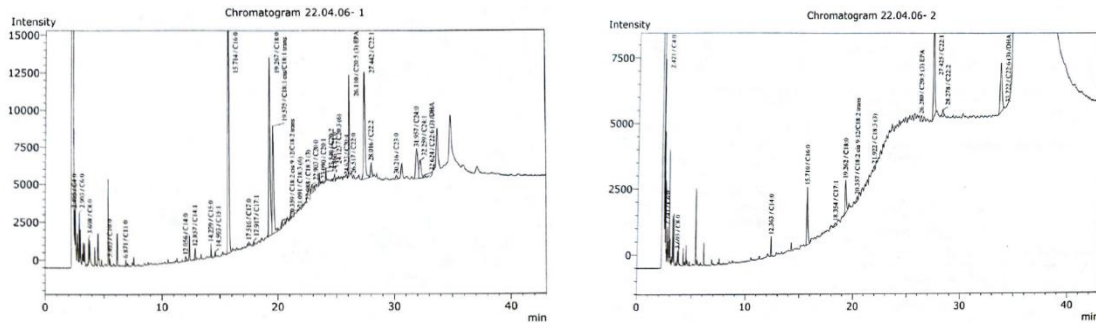


Figure 6. Analysis of fatty acids in egg yolks by GC/MS

Шүүн хэлэлцэхүй

Фосфолипидээс липосом үүсгэн цэвэршүүлэхэд Avanti® Polar Lipids фильтрийн цомог ашиглан мембран шүүлтүүрээр цага нанометртэй липосом цэвэршүүлэн гарган авч болдог. Бид триацилглицерол болон холестеролоос фосфолипид ялгаж цэвэршүүлэхдээ органик уусгагчийг Tokarska нарын арга ашиглан цэвэршүүлэв. Gładkowski [7] нарын судалгааны үр дүнгээр фосфолипидийн гарц 86.3%-аас дээш байсан бол бидний судалгаагаар 42,5% болон 50,7% байсан. Цагаан өндгөнд фосфолипидийн гарц бага боловч, үндсэн тосны хүчил болох палмитины хүчил 26.94% байгаа нь таньцын туршилтын үр дүнтэй шууд холбоотой гэж үзэж байна. Ramana L [11] нарын судалгааны багууд 2010 онд липосомын бүтцийг нано хэмжээстэй харьцуулан электрон микроскопоор зураг дарж баталгаажуулсан

нь бидний судалгааны зурган үр дүнтэй адилхан бөөрөнхий, зуйван бүтэц үүсгэж байсан. Ингэхдээ холестеролоос нь 1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PLPC) цэвэршүүлэхдээ газ хроматографитай хосолсон масс спектрометр (GC-MS)-ээр 89% хүртэл цэвэршүүлж, липосомтой дээжийг хөлдөөж хатаасны дараа гэрлийн микроскопоор нанохэсгийг хэмжсэн. Chen T нар [12] липосомд бодис агуулагдаж байгаа эсэхийг энергийн флуоресценцтэй хосолсон гэрлийн микроскопоор харьцуулан судалж баталгаажуулсан байдаг.

Цаашид органик уусгагч болон багажит цэвэршүүлэх аргыг хослуулан фосфолипид ялгахад гарц нэмэгдүүлэх, зөөвөрлөгчөөр ашиглах боломжийн судалгааг нарийвчлан хийх шаардлагатай байна.

Дүгнэлт

1. Цагаан өндөгний шараас ялгасан фосфолипидийг масс спектрийн хийн хроматографийн (GC/MS) аргаар шинжлэхэд палмитин (*Palmitic acid*)-ы хүчил 26.94%, олеины хүчил(*Oleic acid*) 11.77% агуулагдаж байв.

2. Липосом нь гидрофоб болон гидрофил шинж чанараас хамааран орон зайн бүтцийн

хувьд савх болон бөмбөлөг хэлбэр үүсгэж байгаа нь электрон микроскоптой хосолсон энергийн дисперсийн рентген флуоресценц (SEM-EDS)-ийн шинжилгээгээр батлагдав.

3. Тосон суурьт болон усанд уусдаггүй нэгдлүүдийг липосом ашиглан тээвэрлэх боломжтой нь таньцын туршилтаар тогтоогдов.

Талархал

Энэхүү судалгааны ажлыг санхүүжүүлсэн БШУЯам болон ШУТСан, хэрэгжүүлэх нөхцөл бололцоогоор хангасан МЭХүрээлэн,

Ашигласан бүтээлийн жагсаалт

- [1] S. Innis, A. Davidson, F. George, S. Melynk, S. James. (2007). "Choline-related supplements improve abnormal plasma methionine-homocysteine metabolites and glutathione status in children with cystic fibrosis", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 85, pp. 702-708. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.3.702>
- [2] C. Gool, M. Zeegers, C. Thijs. (2004). "Epidemiology and health services research. Oral essential fatty acid supplementation in atopic dermatitis-a meta-analysis of placebo-controlled trials", *British Journal of Dermatology*, vol. 150, pp. 728-740. <https://doi.org/10.1111/j.0007-0963.2004.05851.x>
- [3] F. D. Gunstone, "Phospholipid technology and applications", 1st edition, pp. 83-94, 2008. <https://doi.org/10.1533/9780857097880.83>
- [4] A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins. (1965). "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids", *Journal of Molecular Biology*, vol. 13, 238-252 [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6)
- [5] G.Gregoriadis, B.E. Ryman, (1972). "Fate of protein-containing liposomes injected into rats. An approach to the treatment of storage disease", *European Journal of Biochemistry*, vol. 24, pp. 485-491. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1972.tb19710.x>
- [6] G. Gregoriadis. (2016). "Liposomes in drug delivery: How it all happened", *Pharmaceutics*, 2016. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8020019>

усанд уусдаггүй куркумин нэгдлээр туслалцаа үзүүлсэн доктор Б.Баярмаад тус тус талархал илэрхийлье.

- [7] W. Gładkowski, A. Chojnacka, G. Kielbowicz, T. Trziszka, C. Wawrzenczyk. (2012). "Isolation of Pure Phospholipid Fraction from Egg Yolk", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 89, pp. 179-182. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1893-x>
- [8] B. Tokarska, M. Clandinin. (1985). "Extraction of egg yolk oil of reduced cholesterol content", *Can Inst Food Sci Tech J Vol.* 18, pp. 256-25. [https://doi.org/10.1016/S0315-5463\(85\)71925-6](https://doi.org/10.1016/S0315-5463(85)71925-6)
- [9] A. Kondratowicz, M. Weiss, W. Juzwa, Ł. Majchrzycki, G. Lewandowicz. (2019). "Characteristics of liposomes derived from egg yolk", *Open chemistry*, vol. 17, pp. 763-778. <https://doi.org/10.1515/chem-2019-0070>
- [10] GE healthcare (2019). Biacore sensor surface handbook. <https://www.gelifesciences.co.jp/>
- [11] L. Ramana, S. Sethuraman, U. Ranga, and U. Krishnan. (2010). "Development of a liposomal nanodelivery system for nevirapine", *Journal of Biomedical Science*, vol. 17, pp. 1-9. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-57>
- [12] L. Fan, Q. Wu, M. Chu. (2012). "Near infrared fluorescent chlorophyll nanoscale liposomes for sentinel lymph node mapping", *International Journal of Nanomedicine*, vol. 7, pp. 3071-3080. <https://doi.org/10.2147/IJN.S27546>

Possibility to transfer of biological activities compounds by liposomes

Bolortsetseg Tsedevsuren¹, Enkhmart Sanjdorj², Bilguun Byambajav², Maral-Erdene Darisuren², Enkh-Oyun Tulgaa², Munkhjargal Burenjargal¹, Budragchaa Davaanyam^{2*}

¹ Department of Chemistry, School of Arts and Sciences, National University of Mongolia, Youth Avenue 1, 14200, Ulaanbaatar, Mongolia

² Laboratory of Metabolism and Biochemistry, Institute of Veterinary Medicine, Mongolian University of Life Sciences, Zaisan 17029, Ulaanbaatar, Mongolia

*Corresponding author: d.budragchaa@gmail.com



<https://orcid.org/0000-0001-9418-8064>

Received: 03.02.2022

Revised: 26.05.2022

Accepted: 15.06.2022

Abstract

Research on the use of liposomes as a carrier of bio-active compounds has been carried out extensively due to that liposome-carried drugs have more than 80% activity in reaching target cells. In this study, we conducted research on the possibility of using phospholipids to convert oil and water-insoluble compounds with biological activities into water-based compounds. This will allow to introduce the advancements in liposomal delivery of medicinal products practice of human medicine to the veterinary medicine as a promising approach. We prepared liposome extract from egg yolk, then 0.5 ml of 5% potassium-iodine and 0.3 g of cur cumin were transported to the liposome by ultra-sonication method. The measurements of an electron microscope at 500 nm indicate that a spherical phospholipids were formed successfully. As a result of FT-IR spectrophotometry, functional groups of fatty acids were detected at 3400 cm⁻¹, C-H at 2973 cm⁻¹, C=O at 1730 cm⁻¹, and C-O at 1220 cm⁻¹. The ratio of saturated and unsaturated fatty acids by gas chromatography (GC/MS) was 60.44% and 37.91% in white eggs, while 39.41% and 62.02% in brown eggs, respectively.

Keywords: egg yolk, phospholipids, liposomes, oil-based compound