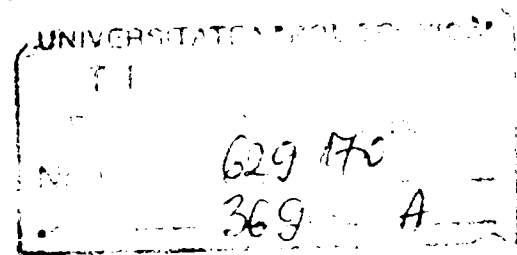


**STUDII ÎN DOMENIUL  
RETINOIZILOR CU APLICAȚII  
BIOLOGICE**

**TEZĂ DE DOCTORAT**

BIBLIOTECA CENTRALĂ  
UNIVERSITATEA "POLITEHNICA"  
TIMIȘOARA

Conducător științific:  
Prof. Dr. chim. CSUNDERLIK CAROL



Candidat:  
Ing. POPOVICI MARINELA GABRIELA

Timișoara  
2000

# CUPRINS

Introducere	1
<i>Partea generală</i>	
1. Retinoizi cu acțiune biologică	3
1.1. Caracteristici generale ale chimiei retinoizilor	4
1.1.1. Istoric. Definiție	4
1.1.2. Structura moleculară. Nomenclatura	6
1.1.3. Clasificarea retinoizilor	9
1.1.4. Proprietățile retinoizilor	12
1.1.4.1. Proprietăți fizice	12
1.1.4.2. Proprietăți chimice	16
1.1.5. Metode de analiză	18
1.1.5.1. Metode de analiză a vitaminei A (retinol)	18
1.1.5.2. Metode de analiză cromatografică HPLC a unor retinoizi din generația I-a	19
1.2. Reprezentanți mai importanți ai retinoizilor: aspecte farmacologice și biochimice	21
1.2.1. Retinoizi din generația 1	21
1.2.2. Retinoizi din generația a 2-a	35
1.2.3. Retinoizi din generația a 3-a	39
1.3. Receptori pentru vitamina A și retinoizi sintetici	41
1.3.1. Introducere	42
1.3.2. Proteine de legare a retinoizilor	43
1.3.3. Proteina celulară de legare a acidului retinoic	44
1.3.4. Mecanismul de acțiune a acidului retinoic	45
1.3.5. Receptori nucleari pentru acidul retinoic	47
1.4. Toxicologia retinoizilor	50
1.4.1. Modificări la nivelul tegumentului și a structurilor anexe	50
1.4.2. Modificări ale sistemului osos	56
1.4.3. Efecte hematologice	57
1.4.4. Modificări hepatice	57
1.4.5. Modificări testiculare	57
1.4.6. Modificări la nivelul sistemului nervos central	58
1.4.7. Teratogeneza și toxicitatea reproductivă a retinoizilor	58
1.5. Bibliografie	58

2. Prepararea, caracterizarea și evaluarea acțiunii și toleranței cutanate a unui dermopreparat cu acid retinoic inclus în lipozomi	63
2.1. Prepararea și caracterizarea unor lipozomi cu acid retinoic all-trans (tretinoin)	63
2.1.1. Introducere	63
2.1.2. Metoda de preparare	65
2.1.2.1. Materiale și metode	65
2.1.2.2. Modul de lucru	66
2.1.2.3. Rezultate și discuții	67
2.1.3. Studiul factorilor care influențează încorporarea acidului retinoic în lipozomi	69
2.1.3.1. Materiale și metode	70
2.1.3.2. Rezultate și discuții	73
2.1.4. Studiul stabilității lipozomilor cu acid retinoic	75
2.1.4.1. Materiale și metode	76
2.1.4.2. Rezultate și discuții	76
2.1.5. Concluzii	77
2.2. Formularea unui hidrogel de uz topic, conținând lipozomi cu acid retinoic	78
2.2.1. Introducere	78
2.2.2. Materiale și metode	79
2.2.3. Rezultate și discuții	82
2.2.4. Concluzii	84
2.3. Evaluarea acțiunii și toleranței cutanate a unor preparate lipozomice și non-lipozomice cu acid retinoic la iepuri	84
2.3.1. Introducere	84
2.3.2. Materiale și metode	87
2.3.3. Rezultate și discuții	92
2.3.4. Concluzii	105
2.4. Farmacocinetica acidului retinoic administrat sub formă de lipozomi la șobolani	106
2.4.1. Introducere	106
2.4.2. Materiale și metode	107
2.4.3. Rezultate și discuții	109
2.4.3.1. Rezultate	109
2.4.3.2. Discuții	111
2.4.4. Concluzii	112
2.5. Bibliografie	113

3. Urmărirea cineticii fototransformării acidului retinoic și argumentarea caracterului radicalic al intermediarilor	116
3.1. Introducere	116
3.2. Reactivi, dispozitive, aparatură utilizate	118
3.3. Metoda de lucru	118
3.4. Rezultate și discuții	119
3.5. Concluzii	157
3.6. Bibliografie	158
Concluzii generale	159

## INTRODUCERE

O vastă literatură în continuă dezvoltare are ca subiect chimia și biologia retinoizilor. Se cunosc numeroase date referitoare la farmacologia și biochimia retinoizilor. Sunt remarcabile realizările din sfera biologiei celulare care au permis în ultimul deceniu identificarea, izolarea și caracterizarea receptorilor nucleari specifici pentru retinoizi; eforturile chimiștilor au fost recompensate prin sinteza unor noi structuri de substanțe cu proprietăți “retinoid like”.

În prezent există două direcții importante pentru optimizarea acțiunii substanțelor medicamentoase. Prima se referă la sinteza de noi molecule biologice active, dar ea este privată de progrese majore, datorită costului enorm al cercetării în această direcție. A doua metodă de optimizare, mult mai accesibilă în prezent prin dezvoltarea unor noi tehnologii și materiale (polimeri) se referă la utilizarea unor sisteme de transport al moleculelor substanțelor medicamentoase la locul țintă specific din organism.

Partea generală a acestei lucrări încearcă o prezentare într-o abordare monografică a datelor din literatură cu privire la retinoizii cu acțiune biologică. Sunt prezentate aspecte mai importante ale chimiei și farmacologiei retinoizilor, acidul retinoic all-trans, considerat prototip al acestei clase, fiind tratat mai detaliat. În partea descriptivă este prezentat mecanismul molecular de acțiune al acidului retinoic și receptorii pentru vitamina A și retinoizii de sinteză. Ultimul aspect al părții generale este dedicat toxicologiei, fiind în mod deosebit tratate efectele adverse produse de retinoizi la nivelul tegumentului (reacția de fotosensibilizare).

Următoarele două capitole conțin contribuțiile personale ale lucrării. Cel de-al doilea capitol al lucrării prezintă o modalitate de reducere a fotosensibilizării cutanate produsă de acidul retinoic și totodată de optimizare a acțiunii vitaminei A prin includerea acesteia într-un sistem de transport la țintă (lipozomi). Evaluarea acțiunii și toleranței cutanate a dermopreparatului realizat a demonstrat pentru preparatul lipozomic o toleranță mult mai bună față de preparatele non-lipozomice studiate.

Al treilea capitol are ca intenție explicarea fotosensibilizării cutanate produsă de acidul retinoic, fenomen observat la toate loturile tratate cu acid retinoic neinclus în lipozomi. Au fost urmărite cinetica fototransformărilor acizilor retinoic all-trans, respectiv 13-cis expuși unor doze de iradiere reduse în

absența și prezența unui captator de radicali liberi: 5(6)-metil-benzotriazol. S-au adus argumente experimentale în favoarea explicării fenomenului de fotosensibilizare produs de acidul retinoic pe baza formării stării excitate triplet dacă acidul a fost supus unei iradierii cu o doză de radiație cu lungime de undă potrivită. Posibilitatea ca moleculele de acid retinoic să treacă în starea excitată triplet, în anumite condiții a fost susținută și prin calcule de chimie cuantică (AM1 și PM3). Faptul că fototransformările acidului retinoic all-trans, cât și a acidului 13-cis retinoic au loc prin intermediul unei stări cu caracter (bi)radicalic (stări electronice triplet) este susținută de observația conform căreia un captator tipic de radicali liberi 5(6)-metil-benzotriazolul modifică viteza ambelor procese.

Cu toate dificultățile pe care le presupune, abordarea unui experiment fotochimic reprezintă o încercare tentantă pentru un cercetător temerar.

Prezenta lucrare încearcă să aducă o modestă contribuție la optimizarea acțiunii și toleranței cutanate a acidului retinoic all-trans și să argumenteze un posibil mecanism molecular pentru reacția de fotosensibilizare cutanată indusă de această vitamină.

---

## *Partea generală*

## Capitolul 1

### RETINOIZI CU ACȚIUNE BIOLOGICĂ

În ultimele două decenii o activitate de cercetare fără precedent, are ca obiect de studiu, vitamina A (retinol) și analogii săi structurali denumiți retinoizi.

Vitamina A și derivații săi naturali sau de sinteză au revenit în atenția cercetătorilor, când s-a realizat că ea este un factor necesar diferențierii normale și creșterii pentru numeroase țesuturi epiteliale, fapt cunoscut încă din 1925 datorită lucrării lui Wolbach și Howe<sup>1</sup>. Numeroase studii au avut ca scop descifrarea modului în care hipo sau hipervitaminaza A poate contribui la apariția leziunilor patologice datorate alterării diferențierii celulare. Rezultatele acestor explorări au fost neașteptat de bune, permițând extinderea utilizării retinoizilor din domeniul dermatologic și în profilaxia și tratamentul unor forme de cancer.

În consecință, eforturile conjugate ale specialiștilor din diferite domenii (biochimiști, chimiști, biologi, farmacologi, patologi, oncologi, dermatologi, toxicologi și epidemiologi) au condus la apariția unei literaturi vaste având ca subiect chimia și biologia retinoizilor, ea fiind abordată sub aspecte variate de la funcțiile retinoizilor și mecanismul lor de acțiune la nivel celular și molecular, metabolismul retinoizilor, rolul lor în diferențiere, efectele retinoizilor în culturi celulare, utilizarea lor în dermatologie și în profilaxia și tratamentul în cancer. Alte cercetări din sfera biologiei celulare au permis în ultimii zece ani realizări remarcabile în identificarea, izolarea și caracterizarea receptorilor specifici pentru retinoizi, denumiți RAR și RXR. Eforturile chimiștilor, în laboratoarele profilate pe acest domeniu din Elveția, SUA și Japonia, au fost recompensate prin descoperirea în ultimii ani a unor noi structuri de retinoizi, cu o activitate și selectivitate crescută pentru receptorii RXR<sup>2</sup> sau pentru receptorii RAR<sup>3</sup> și concomitent, cu efecte toxice mai reduse.

În acest capitol am prezentat date de literatură cu privire la unele aspecte ale chimiei și biologiei retinoizilor cu activitate biologică, ele constituind jaloane în fundamentarea obiectivelor propuse a fi studiate în partea de contribuții personale a lucrării.



## 1.1. Caracteristici generale ale chimiei retinoizilor

### 1.1.1. Istoric. Definiție

Istoria vitaminelor constituie un episod important din istoria biochimiei, cu o influență profundă asupra sănătății oamenilor, precum și asupra înțelegerii proceselor biochimice din organismele vii.

Termenul de vitamină a fost introdus în biochimie în 1912 de Funk, care studiind factorul anti beri-beri, atribuie denumirea de vitamină unei substanțe indispensabile vieții, care avea în structura sa și o funcție amino. Denumirea de vitamină s-a păstrat, deși nu toate substanțele din această clasă de compuși organici, descoperite ulterior, conțin azot în molecula lor. În 1914, Mc Collum și Davis au izolat un compus din fracțiuni lipidice, numit factor de creștere A, capabil să vindece xeroftalmia. Tot Mc Collum, doi ani mai târziu, a evidențiat deosebirea între cele două vitamine și le-a clasificat în două grupe “liposolubilă A” și “hidrosolubilă B”; ulterior, în 1920, Drummond<sup>4</sup> a redenumit cele două grupe, vitamina A și vitamina B și a propus ca viitori membri ai seriei să fie denumiți vitamina C, vitamina D etc.

În această perioadă s-a stabilit că produsele alimentare de origine animală sunt în general mai bogate în vitamina A decât cele vegetale. Ficatul unor pești marini și de apă dulce, laptele, gălbenușul de ou etc. au un conținut mai ridicat în vitamina A decât fructele, legumele și semințele unor plante superioare. S-a evidențiat de asemenea existența unor deosebiri în ceea ce privește conținutul vitaminei A în diferitele soiuri și varietăți de porumb, morcovi, soia, roșii etc.

În 1934 Wald a izolat din retina animală o substanță pe care a denumit-o retinen; zece ani mai târziu Morton a sugerat că ea este aldehida vitaminei A și împreună cu Goodwin i-au dat denumirea de retinaldehida.

Structura corectă a vitaminei A (retinol) cu formula brută  $C_{20}H_{30}O$  a fost determinată de P. Karrer<sup>5</sup> în 1931, care a izolat-o sub forma unui ulei gălbui din porțiunea nesaponificabilă a uleiului gras din ficatul unui pește oceanic (*Hippoglossus vulgaris*). Karrer a propus pentru vitamina A denumirea de axeroftol, bazată pe proprietatea vitaminei în prevenirea xeroftalmiei. Obținerea vitaminei A – retinol în formă cristalină (izomerul all-trans) a reușit mai târziu, fiind realizată de Holmes și Corbet<sup>6</sup> în 1937, apoi de Baxter și Robeson<sup>7</sup> în 1941.

care cinci ani mai târziu au reușit și izolarea în formă cristalină a (13Z)-retinolului.

O contribuție importantă privind cunoașterea surselor de vitamină A pentru om și animale a adus-o T. Moor în 1930 care, analizând țesutul hepatic al animalelor de experiență a demonstrat că preparatele de caroten extrase din plante, administrate șobolanilor avitaminizați sunt transformate de organismul animal în vitamina A<sub>1</sub>. Rezultatele experiențelor lui T. Moor au fost repetate ulterior și cu alte animale, fiind confirmate de numeroși cercetători, fapt care i-a determinat pe H. Euler și P. Karrer să concluzioneze în 1938 pe baza unui bogat material experimental, că pigmentii carotenoidici extrași din plante au aceleași proprietăți ca și vitamina A<sub>1</sub>, denumindu-i provitamine A. Acești cercetători au considerat că transformarea carotenoidelor în vitamine A s-ar realiza în ficat, sub acțiunea carotenazei. Cercetările ulterioare au arătat că acest proces se realizează preponderent în intestinul subțire și foarte puțin în ficat, dar nu toate carotenoidele se pot transforma în vitamina A, ci numai acelea care au în moleculă un inel β-iononic nesubstituit (vezi fig. 1.9, metabolismul vitaminei A).

A doua vitamină A, denumită vitamina A<sub>2</sub>, a fost identificată în uleiul izolat din ficatul unor pești de apă dulce, de Wald și concomitent de E. Lederer în 1937. Compusul a fost izolat în 1948 și Karrer a stabilit că vitamina A<sub>2</sub> este o dehidro-vitamină A cu formula brută C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O. Vitamina A<sub>2</sub> s-a obținut sub formă cristalizată<sup>8</sup> în 1962.

Omul și animalele nu pot sintetiza “de novo” vitaminele A, dar le pot obține din alimente în cantități suficiente prin transformarea carotenoidelor provitaminice în vitamina A.

### **Definiție.**

Termenul de retinoid a fost introdus de Sporn et al.<sup>9</sup> din 1976 pentru a permite extinderea acestei clase de compuși și pentru a sublinia legătura lor cu steroizii.

Comisia pentru nomenclatură a Uniunii Internaționale de Chimie Pură și Aplicată (IUPAC) împreună cu comisia similară a Uniunii Internaționale de Biochimie (IUB) au stabilit în 1982 pentru retinoizi următoarea definiție<sup>10</sup>: “Retinoizii sunt o clasă de compuși formați din patru unități izoprenice asociate după modelul « head to tail » (cap-coadă); toți retinoizii sunt formal derivați înrudiți ai unui compus monociclic conținând cinci duble legături carbon-carbon și o grupă funcțională situată la extremitatea terminală a catenei aciclice”.

Această definiție, deși foarte potrivită pentru structurile retinoizilor naturali din generația 1 și de sinteză din generația 1 și 2, s-a dovedit a fi foarte curând rigidă, prin apariția primilor arotinoizi (fig. 1.5).

Sporn și Roberts<sup>11</sup> au propus o nouă definiție în 1985 pentru termenul de retinoid, ca fiind: “orice substanță care poate produce un răspuns biologic specific prin fixarea și activarea unui receptor specific sau a unui set de receptori, răspunsul biologic al celulei țintă fiind determinat mai ales de receptorul retinoidic decât de ligandul însuși”.

Liganzii clasici sunt considerați retinolul și/sau acidul retinoic.

### 1.1.2. Structura moleculară. Nomenclatura

Sub numele de vitamina A sunt cunoscute o serie de substanțe asemănătoare chimic cuprinse în diferite țesuturi: retinol (vitamina A - alcool, vitamina A<sub>1</sub>), 3-dehidroretinol și esteri ai acestora - în principal retinol palmitat, retinal (vitamina A - aldehydă) și acidul trans retinoic (vitamina A acid, tretinoin).

Scheletul structurii moleculare a retinoizilor conform recomandărilor IUPAC – IUB<sup>10</sup> este prezentat în fig. 1.1. În fig. 1.1, 1.2 și 1.3 sunt prezentate formulele moleculare ale retinolului (1), retinal (2), acid retinoic (3), 3,4-dehidroderivații acestora (4), (5), (6) și retroretinoizii (7), (8), (9).

- ✓ Conform regulii Ret-2 din recomandarea IUPAC – IUB<sup>10</sup>, denumirea stereoizomerului implică o configurație trans la toate cele patru duble legături ale catenei polienice.

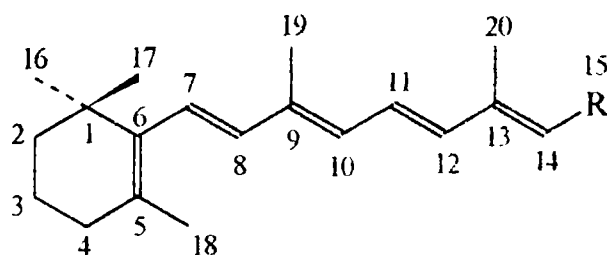


Fig. 1.1 Scheletul structurii moleculare a retinoizilor

R	
1. CH <sub>2</sub> OH :	Retinol (vitamina A - alcool, vitamina A <sub>1</sub> , axeroftol)
2. CHO :	Retinal (vitamina A - aldehydă)
3. COOH :	Acidul retinoic (vitamina A acid, tretinoin)

Structura moleculară a compușilor (1), (2) și (3) dehidrogenați la nucleu (în poziția 3,4) este prezentată în fig. 1.2.

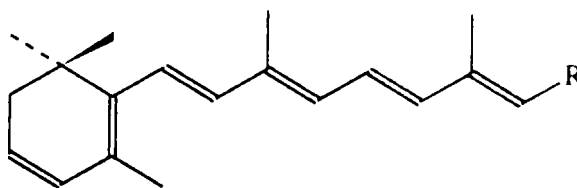


Fig. 1.2 Structura moleculară a 3,4 dehidroderivaților vitaminelor A<sub>1</sub>

R	
4. CH <sub>2</sub> OH :	3,4-dehidroretinol
5. CHO :	3,4-dehidroretinal
6. COOH :	Acid 3,4-dehidroretinic.

Structura moleculară a *retroretinoizilor* (compuși care față de structura de bază prezintă o deplasare cu o poziție a dublelor legături) este prezentată în fig. 1.3.

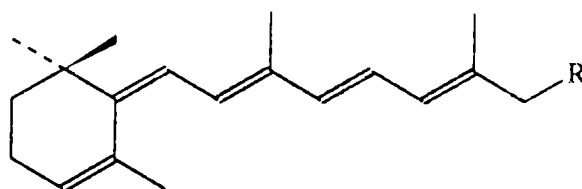


Fig. 1.3 Structura moleculară a *retroretinoizilor*

R	
7. CH <sub>2</sub> OH :	<i>Retroretinol</i>
8. CH <sub>2</sub> OAc :	<i>Retroretinil acetat</i>
9. COOH :	Anhidroretinol.

- ✓ Conform regulii Ret-5.2 din recomandarea IUPAC – IUB<sup>10</sup>, prefixele E sau Z trebuie să fie utilizate întotdeauna pentru fiecare dublă legătură a catenei, chiar dacă schimbarea configurației trans s-a produs la o singură dublă legătură. Exemplele sunt ilustrate în fig. 1.4:

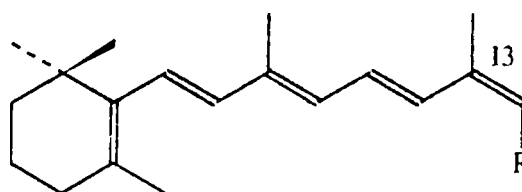


Fig. 1.4 Structura moleculară a 13-cis-retinol și a acidului 13-cis-retinoic

R	
CH <sub>2</sub> OH :	13-cis-retinol sau (7E, 9E, 11E, 13Z)-retinol (Neovitamina A)
COOH :	Acidul 13-cis-retinoic sau (7E, 9E, 11E, 13Z)-acid retinoic (Izotretinoin)

### Sistemul de numerotare

Sistemul de bază al numerotării pozițiilor în structura retinoizilor este prezentat în fig. 1.1. El respectă sistemul adoptat de comisia de nomenclatură IUPAC – IUB cu privire la numerotarea carotenoizilor<sup>12</sup>.

Structurile moleculare ale unor retinoizi importanți din generațiile 1, 2 și 3 sunt prezentate în fig. 1.5.

Dintre vitaminele A și derivații acestora, cea mai importantă și mai larg răspândită este vitamina A<sub>1</sub> (retinol, axeroftol).

Din punct de vedere chimic vitamina A<sub>1</sub> este un alcool ce conține în moleculă un inel β-iononic hidrocarbonat, o catenă laterală formată din 9 atomi de carbon, cinci duble legături conjugate și cinci radicali metil. Părțile structurale caracteristice s-au evidențiat prin următoarele reacții<sup>13</sup>:

- nucleul β-iononic s-a pus în evidență prin formarea unei molecule de acid geronic, prin oxidarea vitaminei A<sub>1</sub> cu ozon;
- gruparea alcoolică primară s-a identificat atât prin reacția de esterificare cât și prin formarea retinalului, printr-o oxidare blândă și respectiv a acidului retinoic, prin oxidare energetică;
- conține cinci duble legături (una în ciclul β-iononic și patru în catena laterală) care prin reducere catalitică se hidrogenează, iar vitamina A<sub>1</sub> se transformă în perhidrovitamină cu formula moleculară C<sub>20</sub>H<sub>40</sub>O, lipsită de activitate vitaminică;
- cele două grupări metil din catena laterală se pun în evidență prin formarea a două molecule de acid acetic, în urma degradării catenei laterale prin oxidare cu permanganat de potasiu în mediu bazic;
- cele trei grupări metil fixate pe nucleul β-iononic de la C<sub>16</sub>, C<sub>17</sub>, C<sub>18</sub> se pun în evidență prin formarea a trei molecule de acid acetic în urma oxidării vitaminei A<sub>1</sub> cu acid cromic la cald.

Vitamina A<sub>1</sub> conține o grupare alcoolică primară la C<sub>15</sub> în poziția trans și are o configurație all-trans, iar neovitamina A<sub>1</sub> are tot o grupare alcoolică primară la C<sub>15</sub>, dar în poziția cis și deci configurație trans-cis.

Vitamina A<sub>2</sub> are două duble legături conjugate în inelul β-iononic, una situată între atomii de carbon C<sub>5</sub> și C<sub>6</sub>, la fel ca la retinol, iar cea de-a doua dublă legătură se găsește între atomii de carbon C<sub>3</sub> și C<sub>4</sub>. Prin oxidare poate forma 3,4-dehidroretinolul și respectiv 3,4-dehidro-acidul retinoic.

Vitamina A-acid (tretinoin) este din punct de vedere chimic un acid ce conține în moleculă cu excepția grupării carboxil de la C<sub>15</sub> aceleași componente ca și vitamina A<sub>1</sub> (retinol).

Un alt retinoid natural este all-trans retinalul (retinaldehida) cu rol important în funcția retinei.

Datorită diferențelor în implicarea metabolică a retinoizilor naturali, funcțiile lor fiziologice și acțiunile biologice sunt deseori asemănătoare dar nu sunt și identice. De aceea, termenul de “vitamină A” ar trebui să fie rezervat numai pentru retinol.

### 1.1.3. Clasificarea retinoizilor

De la sinteza totală a retinolului realizată de Isler et al.<sup>14</sup> în 1947 au fost obținuți numeroși derivați ai retinoizilor.

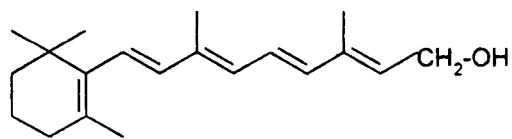
Inițial, modificările au fost realizate la gruparea ciclică<sup>15</sup>, catena polienică<sup>16</sup>, sau la gruparea polară terminală<sup>17, 18</sup>. În ultimii ani au fost sintetizați prin modificări importante ale structurii moleculare de bază noi compuși, denumiți arotinoizi, respectiv heteroarotinoizi (vezi fig. 1.5) cu păstrarea activității de tip “retinoid-like”. Numărul de retinoizi sintetici preparați este estimat în prezent la peste 1500 și este în continuă creștere.

Retinoizii pot fi clasificați, în funcție de momentul apariției lor, în trei grupe distincte:

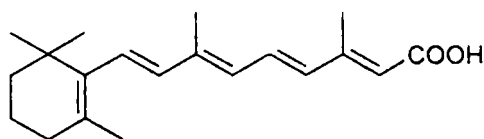
1. **Retinoizi din generația 1:** *retinolul (vitamina A)* și toți compușii care pot proveni din metabolizarea sa: *retinaldehida*, *acidul retinoic all-trans (tretinoin)* și *acidul 13-cis retinoic (izotretinoin)*.
2. **Retinoizi din generația a 2-a.** Această grupă cuprinde analogi de sinteză care prezintă modificări parțiale ale structurii de bază și produc numai o parte din acțiunile farmacodinamice ale vitaminei A. Compușii principali sunt: *etretinatul* și *acitretinul*.
3. **Retinoizi din generația a 3-a.** Sunt compuși obținuți prin modificări importante ale structurii moleculare de bază, cu scopul obținerii de substanțe care să producă numai o anumită acțiune biologică a vitaminei A și în plus efecte adverse minime. Sunt incluși în această clasă: *arotinoizii* și *heteroarotinoizii*.

Structurile chimice ale unor retinoizi din generațiile 1,2 și 3 sunt prezentate în fig. 1.5.

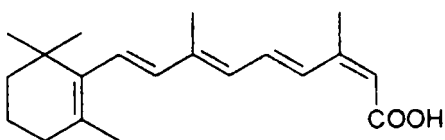
Generația 1



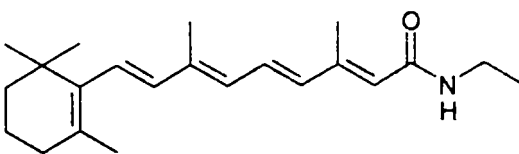
All trans retinol  
Vitamina A



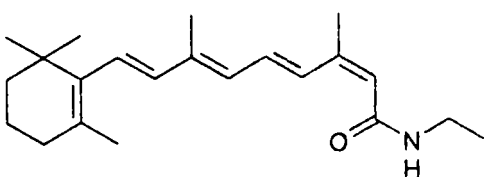
Acid all-trans retinoic  
Tretinoin  
AIROL



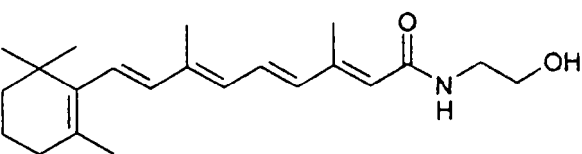
Acid 13-cis retinoic  
Izotretinoin  
ROACCUTANE



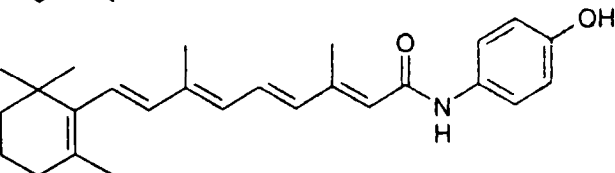
N-etil retinamida  
NER



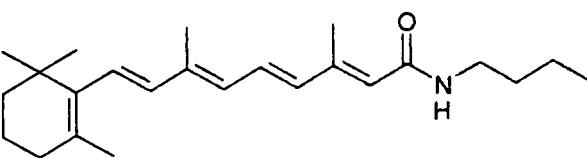
13-cis N-etil retinamida  
13-cis NER



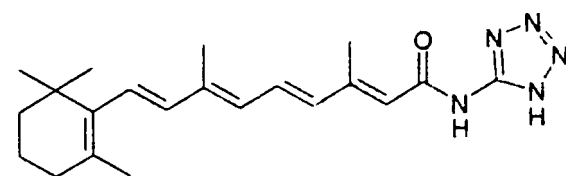
N-(2-hidroxietil) retinamida  
2-HER



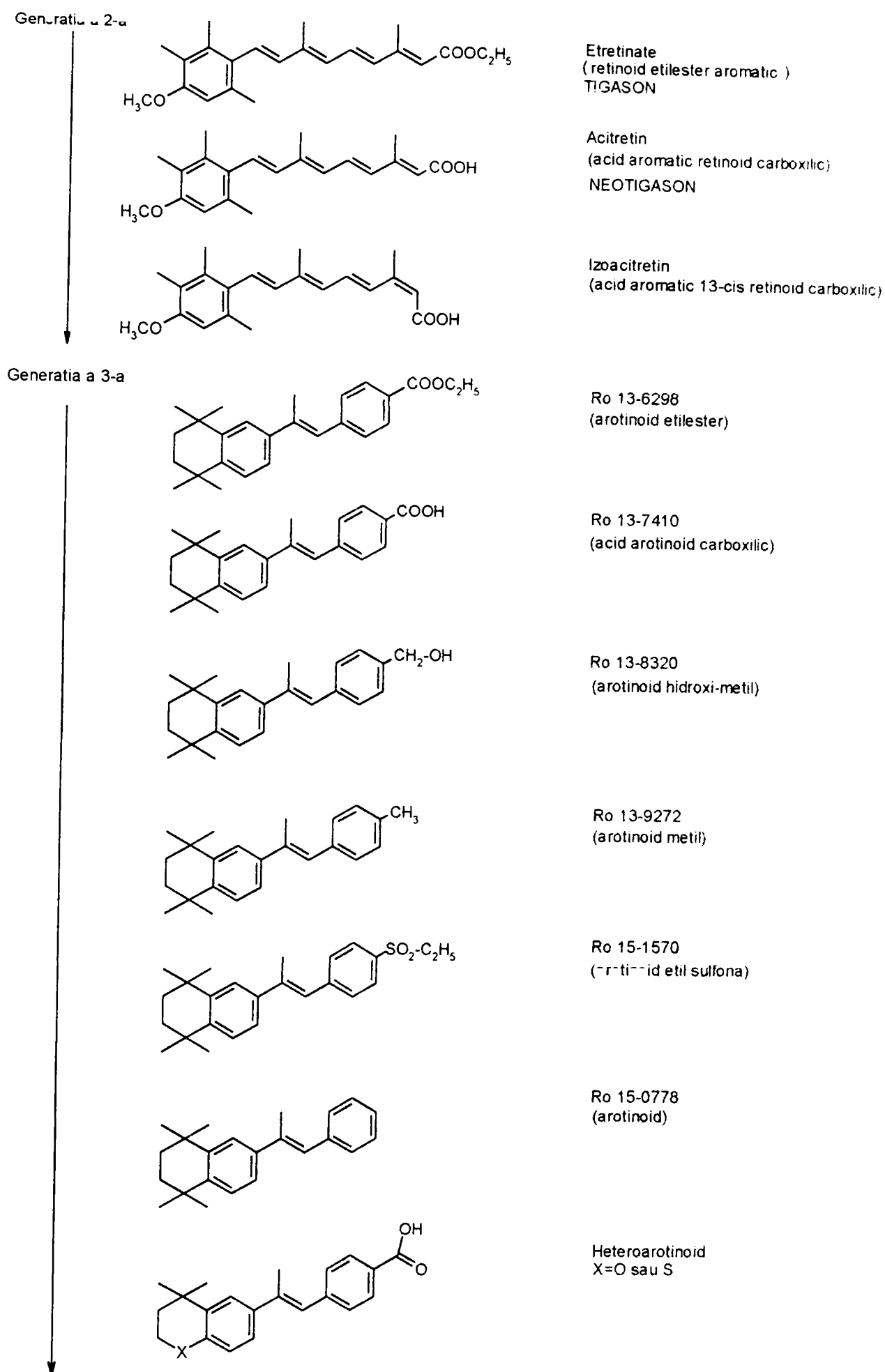
N-(4-hidroxiifenil) retinamid  
4-HPR



N-butil retinamida  
NBR



N-te razol-5-il retinamid  
TZR



1 Fig. 1.5 Structurile chimice ale retinoizilor din generațiile 1, 2 și 3



## 1.1.4. Proprietățile retinoizilor

### 1.1.4.1. Proprietăți fizice

Retinolul (vitamina A<sub>1</sub> - alcool) este un ulei galben, optic inactiv, care se obține în stare pură sub formă de cristale lamelare de culoare galbenă; vitamina A<sub>2</sub> a fost izolată sub forma unui ulei galben. Ambele vitamine sunt insolubile în apă, solubile însă în grăsimi, uleiuri, solvenți organici (cloroform, acetonă, benzen, ciclohexan). În alcooli (metilic, etilic) se dizolvă în proporții diferite. Retinolul în stare cristalină poate fi dispersat în apă.

Solubilitatea retinalului și a compușilor 3,4-dehidro-retinol și 3,4-dehidro-retinal este asemănătoare cu cea a retinolului.

Acidul retinoic all-trans (tretinoin) este o pulbere cristalină de culoare galbenă sau galben portocaliu deschis; este o substanță practic insolubilă în apă, solubilă în eter și ușor solubilă în cloroform, alcooli (metanol, etanol), dimetilsulfoxid. Acidul 13-cis-retinoic (izotretinoinul) este o pulbere de culoare galben portocaliu intens și are solubilitatea asemănătoare cu tretinoinul.

Purificarea retinolului, a esterilor săi (acetat de retinol) și a retinalului se poate realiza cu rezultate bune prin distilare avansată în vid (retinolul la 125° C, acetatul de retinol la 120° C și presiune de 400 Pa).

Punctele de topire și valorile spectroscopice în UV (absorbanta și extincția specifică) a vitaminelor A și a unor derivați mai importanți ai acestora sunt prezentate în tabelul 1.1

Prezența dublelor legături în catena laterală permite și existența izomerilor Z, unii dintre aceștia fiind și compuși naturali. Astfel, all-trans retinolul este deseori însoțit de izomerul său cis. Compusul (11Z)-retinal este important ca grup prostetic care formează cu opsina, la întuneric, rodopsina.

Dintre stereoizomerii acidului retinoic, acidul 9-cis retinoic prezintă cea mai mare afinitate<sup>19</sup> pentru receptorul nuclear RXRα.

Tabelul 1.1  
Date caracteristice ale compușilor vitaminei A și a unor derivați mai importanți ai acesteia\*

Compusul	Punctul de topire, °C	Absorbanta UV (în etanol)	$\epsilon^{1\%}_{1\text{cm}}$	Activitatea biologică** (%)
		$\lambda$ , nm		
Retinol	62-64	325	1835	100
(13Z)-retinol	58-60	328	1686	75
Retinal	61-62	381	1530	91
(11Z)-retinal	64-65	254, 290, 376	614, 412, 878	48
Acid retinoic	179-180	350	1510	
Acid (13Z)-retinoic	174-175	354	1325	
Acetat de retinol	57-60	326	1550	
Palmitat de retinol	28-29	327	975	
3-dehidroretinol	63-65	276, 286, 350	555, 715, 1455	40
3-dehidroretinal	78-79	(314), 401	395, 1470	
Acid 3-dehidroretinoic	183-185	(305), 370	443, 1395	

\* Valorile corespund izomerilor (all-E) dacă nu este specificat altfel.

\*\* Testul curativ al creșterii la șobolan

Întrucât molecula vitaminei A conține 4 duble legături conjugate în catena laterală, este posibil să existe teoretic 16 forme stereoizomerice (izomeri E și Z). Ușurința izomerizării depinde de poziția dublei legături din catena polienică. În timp ce dublele legături trisubstituite din catena laterală (poziția 9 și 13) sunt stabile cu configurația Z, legăturile duble disubstituite (poziția 7 și 11) se izomerizează rapid la forma E, mai stabilă<sup>20</sup>.

Modelul general al izomerizării<sup>20</sup> vitaminelor A este prezentat în fig. 1.6.

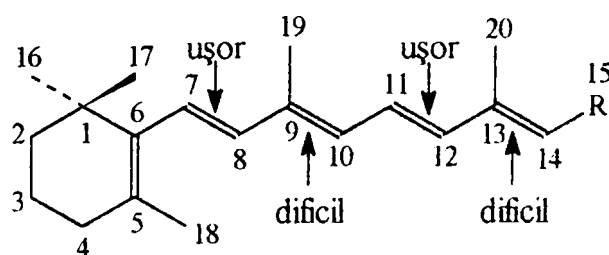
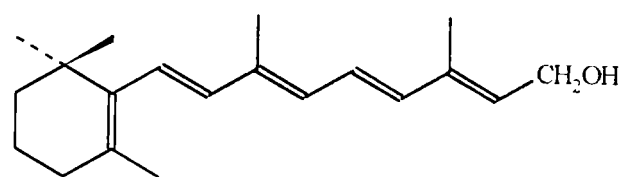


Fig. 1.6 Modelul general al izomerizării vitaminelor A

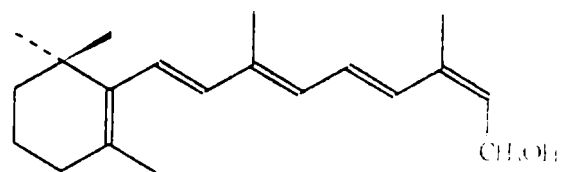
În cazul legăturilor duble cis neîmpiedicate steric, interacțiunea sterică 1,4 între cei doi atomi de hidrogen vecini este slabă, în schimb interacțiuni sterice puternice au loc între o grupare metil și atomul de hidrogen vecin sau între două grupe metil învecinate. În concluzie, numărul de izomeri sterici posibil este mult

mai mic decât cel calculat teoretic, fără îndoială una dintre cauze fiind împiedicarea sterică.

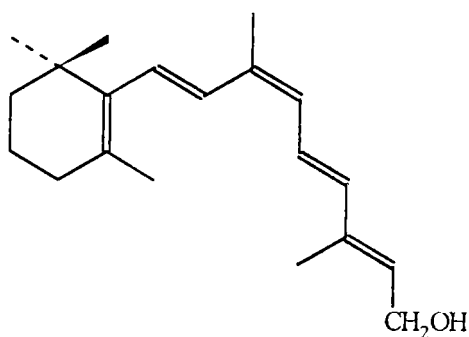
Din cei 16 stereoizomeri posibili ai retinolului se cunosc până în prezent 6 cu structura moleculară prezentată în fig. 1.7.



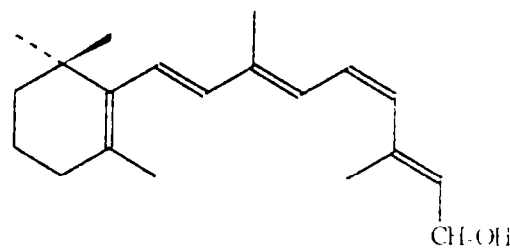
All-trans-retinol (Vitamina A<sub>1</sub>)



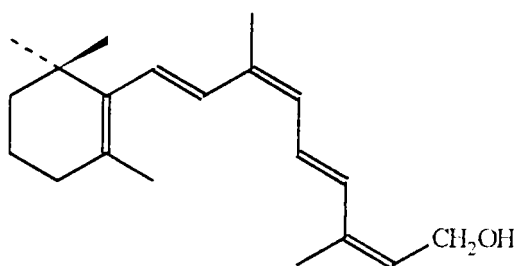
13-cis-retinol (Neovitamina Aa)



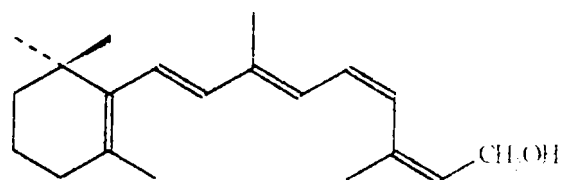
9-cis-retinol (Izovitamina Aa)



11-cis-retinol (Neovitamina Ab)



9,13-di-cis-retinol (Izovitamina Ab)



11,13-di-cis-retinol (Neovitamina Ac)

Fig. 1.7 Structura moleculară a unor stereoizomeri naturali și obținuți prin sinteză a vitaminei A<sub>1</sub> – alcool

Dintre stereoizomerii menționați în fig. 1.7, vitamina A<sub>1</sub> și neovitamina A sunt izomeri naturali, iar restul s-au obținut prin sinteză. Când toate dublele legături ale stereoizomerilor sunt în poziție trans, se folosește denumirea de trans-total sau de all-trans, iar când dubla legătură terminală se găsește în poziția cis, se utilizează prefixul “neo”.

Toți izomerii trans-totali au activitate vitaminică ridicată. Activitatea vitaminică a retinolului chimic pur este folosită pe plan internațional ca standard, fiind apreciată ca 100%. Restul izomerilor au o activitate vitaminică mai slabă decât a retinolului.

Activitatea biologică a retinolului se exprimă pe plan internațional prin unități internaționale (UI). O unitate internațională (UI) este echivalentă cu activitatea vitaminică a 0,3 μg de retinol pur sau cu 0,344 μg de acetat de retinol pur, sau cu 0,55 μg de transretinol-palmitat.

În scopuri practice activitatea vitaminică potențială a alimentelor se exprimă în retinol echivalenți (RE). Un miligram retinol echivalent = 6 mg all-trans-beta-caroten = 12 mg de alte carotenoide. Un mg RE corespunde la 3333 UI.

Activitatea vitaminică<sup>21, 22</sup> a unor izomeri ai retinolului sub formă de acetati și a unor compuși retinoici este prezentată în tabelul 1.2.

*Tabelul 1.2*

*Activitatea vitaminică a unor izomeri ai retinolului sub formă de acetati și a unor compuși retinoici exprimată în UI / g*

Izomeri	Activitate vitaminică (UI / g)	Biopotența (%)
All-trans-retinol	2.904.000	100
13-cis-retinol	2.190.000	75
9-cis- retinol	607.000	21
9,13-di-cis- retinol	680.000	24
11-cis- retinol	690.000	24
11,13-di-cis- retinol	428.000	15
Compuși retinoici	Activitate vitaminică (UI / g)	Biopotența (%)
Retinol (vitamina A <sub>1</sub> )	3.330.000	115
Acetat de retinol – trans total	2.904.000	100
Acid retinoic (metil-ester)	-	100
5,6-epoxi-retinol	-	108
5,8-epoxi-retinal	-	60
Acid metil-5,8-epoxi-retinoic	-	80

Analiza cu raze X a retinolului, a esterilor săi<sup>23</sup>, precum și a retinalului<sup>24</sup> a stabilit o conformație moleculară 6,7-s-cis a structurilor cristaline. În cazul acidului retinoic au fost evidențiate două modificări diferite ale sistemului cristalin<sup>25</sup>: o formă stabilă 6,7-s-cis (sistem triclinic) și o formă instabilă, 6,7-s-trans (sistem monoclinic).

Vitamina A<sub>2</sub>, retinalul și acidul retinoic pot forma stereozomeri similari retinolului, întrucât dispun de același sistem polienic și grupări metilice.

În natură, izomerii cis ai retinoizilor au o răspândire mai redusă decât izomerii trans.

#### 1.1.4.2. Proprietăți chimice

Atât vitamina A<sub>1</sub>, cât și vitamina A<sub>2</sub> sunt substanțe autoxidabile, termostabile în absența aerului, foarte sensibile la acțiunea oxidanților și a luminii, în special a radiațiilor ultraviolete.

Prin autotoxidare, acidul retinoic, retinalul și retinolul formează un amestec de compuși. Produsul principal al autoxidării acidului retinoic<sup>26</sup> este un 5,6-epoxid cu structura moleculară prezentată în fig. 1.8.

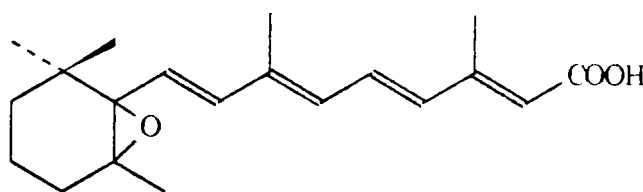


Fig. 1.8 Structura moleculară a acidului 5,6-epoxi-5,6-dihidretinoic

Se consideră că în mod obișnuit, autotoxidarea retinoizilor are loc prin oxidare ( $\alpha$ ) alilică<sup>27</sup>. Un studiu mai recent, realizat cu scopul caracterizării produșilor de autoxidare ai acidului retinoic<sup>28</sup> în soluție de etanol 90% la 25 – 85,5° C a evidențiat obținerea unui amestec de epoxizi, dioxetani, un endoperoxid și produși de degradare oxidativă rezultați prin ruperea dublei legături de la catena laterală. Majoritatea acestor produși par a fi rezultatul unei oxidări directe a catenei olefinice decât al unui proces de oxidare  $\alpha$  alilică.

Vitaminele A sunt foarte ușor degradate sub acțiunea luminii, oxigenului și căldurii, datorită prezenței în molecula lor a dublelor legături conjugate. Prin barbotarea aerului cald la 120° C în ulei cu vitamine A, acestea se degradează complet în maximum 4 ore. Dacă același ulei cu vitamine este încălzit în absența aerului, vitaminele rezistă până la 130° C. Sub acțiunea luminii solare, a radiațiilor X și UV, vitaminele A se degradează până la  $\beta$ -iononă, care se recunoaște prin mirosul de viorele.

Pentru conservarea lor se recomandă ca vitaminele A să fie depozitate la temperatură scăzută (-15° C pentru acidul retinoic), în ambalaje de culoare brună închise etanș, în atmosferă de azot sau heliu și protejate față de lumină și oxigen.

Pentru a evita degradarea și inactivarea vitaminelor A în soluții sau în preparate farmaceutice se adaugă antioxidanți (tocoferol, lecitină, hidrochinonă). În scopuri industriale<sup>21</sup> se recurge la filtrarea soluțiilor vitaminice prin grăunțe de ovăz decorticat care conțin substanțe antioxidante.

În tabelul 1.3 sunt prezentate reacții chimice caracteristice retinoizilor: retinol, retinal, acid retinoic. În principiu ele pot fi valabile și pentru 3,4-dehidroderivații acestora.

Tabelul 1.3

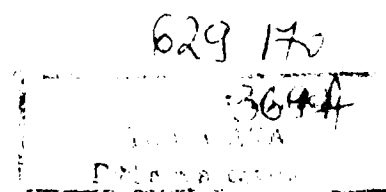
*Reacții chimice caracteristice retinoizilor*

Retinoid	Reactivul utilizat	Prođuși
Retinol	Dioxid de magneziu	Retinal <sup>29, 30</sup>
	Anhidrida acetică	Acetat de retinol
	Clorura de palmitoil	Palmitat de retinol
	Anhidrida maleică	Aducți Diels-Alder
	Oxigen singlet	5,8-peroxid <sup>31</sup>
	Peracizi	5,6-epoxid <sup>32</sup>
	Ozon	Acid geric
	Permanganat de potasiu	Acid acetic
Retinal	Borohidruă de sodiu	Retinol
	Oxid de argint	Acid retinoic
	Oxid de magneziu	4-oxoretinal
Acid retinoic	Alcooli	Esteri retinoici
	Acid glucuronic	Glucuronide
	Hidruă de litiu și aluminiu	Retinol <sup>33</sup>

În toate aceste reacții stereochemia catenei polienice rămâne nemodificată, în absența luminii și a oxigenului.

Vitamina A nu reacționează cu bazele, dar retinolul și esterii săi dau reacții de eliminare în prezența acizilor. Esterii sunt în generali mai stabili decât vitaminele neesterificate. Retinolul cu acizi diluați formează anhidroretinol; acetatul de retinol în diclormetan în prezența acidului bromhidric formează acetat de retroretinol în timp de câteva secunde.

Vitaminele A și derivații acestora reacționează cu ușurință cu oxigenul, hidrogenul, halogenii, formând compuși carotenoidici lipsiți de activitate vitaminică. Vitaminele A în soluție cloroformică în prezența SbCl<sub>3</sub> dau colorații



albastre, cu spectre de absorbție caracteristice. Aceste reacții se folosesc la identificarea și dozarea colorimetrică a vitaminelor A (reacția Carr-Price<sup>34</sup>).

Activitatea biologică a stereoizomerilor E,Z ai vitaminei A, cât și a compușilor retinoici diferă considerabil. Cea mai intensă activitate vitaminică o prezintă (all-E)-retinolul și esterii săi (vezi tabelul 1.2). În scopuri industriale acetatul de retinol poate fi izomerizat fotochimic sau în prezența unor cantități catalitice de compuși de paladiu. Forma all-trans obținută, care predomină la echilibru, se poate separa prin cristalizare din hexan sau metanol.

Acetatul și palmitatul de retinal sunt forme farmaceutice mai stabile frecvent utilizate la obținerea preparatelor farmaceutice ce conțin retinol.

### **1.1.5. Metode de analiză**

#### **1.1.5.1. Metode de analiză a vitaminei A (retinol)**

O caracterizare fără echivoc a vitaminei A<sub>1</sub> – alcool poate fi obținută prin interpretarea spectrului său în UV, prin reacții de culoare și prin determinarea activității sale biologice.

Pentru determinarea purității retinolului, tehnicile cromatografice (mai ales HPLC) au devenit metode de primă alegere și sunt esențiale pentru determinări cantitative și calitative. Determinarea spectrofotometrică este semnificativă numai pentru concentrații relativ mari<sup>35</sup> de vitamină A, deoarece prezența unor mici cantități de impurități, care ar putea interfera, poate determina erori considerabile ale rezultatelor. În această metodă, absorbția în UV se determină la o lungime de undă între 325 și 328 nm în funcție de solvent pentru vitamina A<sub>1</sub> și la 352 nm pentru vitamina A<sub>2</sub>.

Retinolul poate fi determinat și printr-o cunoscută metodă colorimetrică, intensitatea culorii albastre fiind măsurată la 620 nm, după adăugarea reactivului Carr-Price (clorură de stibiu în cloroform). Reacții de culoare caracteristice vitaminei A au fost obținute și cu acidul sulfuric concentrat, triclorura de arsen și trifluorura de bor, iar mecanismele lor de reacție au fost descrise în literatură<sup>36,37,38</sup>. Deși metoda colorimetrică este mai sensibilă decât metoda spectrofotometrică, acuratețea ei este afectată, deoarece colorațiile albastre sunt relativ puțin stabile. În tabelul 1.4 sunt prezentate principalele reacții de culoare folosite la identificarea și dozarea<sup>39</sup> vitaminelor A.

Determinarea fluorimetrică a vitaminei A este considerată o metodă sensibilă și specifică<sup>40</sup>. Totuși, carotenoizii și tocoferolul pot interfera cu această tehnică de determinare a vitaminei A.

Metodele biologice constă în aprecierea scăderii în greutate a șobolanilor în stări de avitaminoză, apariția unui estru fals al femelelor de șobolan castrate, supuse unui regim de avitaminoză, determinarea cantității de retinol depozitată în ficat, testarea efectului curativ al xeroftalmiei etc.

*Tabelul 1.4*

*Reacții pentru identificarea și dozarea vitaminelor A*

Reactiv utilizat	Culoarea produsului obținut
Acid sulfuric concentrat	Albastru închis, intens
Vitamina A (1-2 mg) în cloroform + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc.	Verde, apoi albastru închis
Vitamina A sol. în CHCl <sub>3</sub> + 1-2 pic. HNO <sub>3</sub> fumans	Albastru, apoi verde
Acid formic 95%	Insolubil la rece și la cald, incolor
Acid dicloracetic	La rece, după 1-2 min. soluția devine violetă
Acid cloracetic	Slab verzui, greu solubil
Acid tricloracetic	Albastru închis la rece, reacție instantanee
Acid tricloracetic (0,3 g în 1 ml CHCl <sub>3</sub> ) + 2 mg Vitamina A	Galben, care trece în albastru
Triclorură de arsen	Roșu, care trece repede în albastru
Triclorură de stibiu	Albastru intens închis
Triclorură de stibiu în CHCl <sub>3</sub> + 1-2 mg Vitamina A în 2 ml reactiv	Brun, imediat albastru închis, apoi violet stabil
Tetraclorură de staniu topită	Albastru, violet albastru, violet și cald

Separarea izomerilor<sup>41</sup> cu aceeași polaritate (izomeri cis-trans) se realizează în prezent exclusiv prin tehnicile HPLC, utilizând în cazul retinoizilor o gamă largă de detectori: UV, de fluorescență, de chemiluminescență sau detectori electrochimici.

#### 1.1.5.2. Metode de analiză cromatografică HPLC a unor retinoizi din generația I-a

Realizările remarcabile ale cercetărilor din ultimii 15-20 de ani în domeniul retinoizilor nu ar fi fost posibile fără cromatografia lichidă de înaltă presiune (HPLC) care permite și diferențierea izomerilor retinoizilor.

Retinoizii ridică numeroase probleme analitice care include: sensibilitatea lor la lumină, căldură și oxigen, insolubilitate în soluții apoase, necesitatea



separării izomerilor geometrici, precum și o fixare importantă și puternică de proteine și concentrații mici existente în probele biologice (plasmă, ser, omogenizat de organ).

Dozarea retinoizilor din probele biologice sau atunci când concentrațiile lor sunt foarte mici (studii de fotochimie) se realizează în cele mai multe cazuri în prezent prin tehnici HPLC<sup>41</sup>. În literatura de specialitate sunt prezentate numeroase metode în care sunt folosite diferite aparate și echipamente. În tabelul 1.5 sunt prezentate câteva metode de extracție și dozare a retinoizilor din generația I-a prin HPLC cu fază inversă, ea constituind tehnica de analiză cromatografică utilizată în partea de contribuții personale.

Se constată că la cele mai multe din exemplele prezentate în tabelul 1.5. deproteinizarea plasmei pentru extracția acizilor retinoici se realizează cu solvenții organici: metanol, etanol, cloroform, acetonitril.

În ceea ce privește faza mobilă se remarcă faptul că sistemele bazate pe acetonitril și metanol sunt considerate ambele eficiente fiind cele mai des utilizate pentru determinări analitice ale retinoizilor din generația I-a.

*Tabelul 1.5*

*Metode de extracție și dozare prin HPLC – UV a unor retinoizi din generația I-a*

Substanța analizată	Proba biologică (cantitatea utilizată)	Extracția	Coloana	Faza mobilă	Detecția (nm)	Bibl
13-cis, all-trans RA, retinol, retinal, acetat de retinol	Plasmă (0,1 ml)	0,9% NaCl, metanol, cloroform	Nucleosil C18	Acetonitril – 0,1 M acetat de amoniu 80 : 20	350	42
13-cis, all-trans RA, retinol	Ser (0,2 ml)	0,1 M acetat de amoniu, acetonitril (3 : 1), hexan	Chemosorb 5-ODS-4 50° C	Acetonitril – metanol – 0,1 M acetat de amoniu (46,7 : 23,3 : 30)	340	43
All-trans, 13 cis RA, acitretin (I.S.)	Ser (3,5 ml)	Etanol, 2 M NaOH, Hexan, 2 M HCl, Hexan	Spherisorb ODS-2	10% THF în metanol-apă-17 M acid acetic (84,85 : 15 : 0,15)	350	44
All-trans RA, acetat de retinol all trans (I.S.)	Plasmă (0,5 ml)	Acetonitril	Lichrosorb RP-18	Acetonitril-metanol-apă-10% acetat de amoniu (60 : 16 : 20 : 4)	340	45
13-cis, all-trans RA, 13-cis acitretin (I.S.)	Plasmă (0,5 – 2 ml)	Tampon fosfat (pH = 7) dietileter – acetat de etil (1 : 1)	Nucleosil C18	Metanol : acid acetic 1% (85 : 15)	(A) 350 (B) 360	46 47

Numeroasele date din literatura de specialitate recomandă metoda cromatografică HPLC cu fază inversă ca fiind, dintre tehnicile HPLC, cea mai potrivită pentru separarea retinoizilor și a izomerilor lor (studiată mai ales din probe biologice) pentru toate cele trei generații de retinoizi.

## 1.2. Reprezentanți mai importanți ai retinoizilor: aspecte farmacologice și biochimice

În această parte a primului capitol sunt prezentate unele caracteristici farmacocinetice, ale metabolismului, precum și efectele farmacologice specifice ale unor reprezentanți ai retinoizilor naturali și de sinteză mai importanți din punct de vedere biomedical. Structura moleculară și clasificarea acestor retinoizi sunt prezentate în cadrul subcapitolului 1.1.

Acidul retinoic all-trans (tretinoin) este prezentat mai detaliat întrucât el este substanța organică considerată prototip al clasei retinoizilor, care a fost aleasă pentru realizarea studiilor din partea experimentală a lucrării.

### 1.2.1. Retinoizi din generația 1

#### Retinolul (Vitamina A)

Vitamina A a fost izolată încă din anul 1913 de Mc Collum și Davis ca o substanță denumită inițial “factor de creștere liposolubil A”, iar structura sa, determinată ulterior de Karrer et al. (1931), a fost identificată ca fiind corespunzătoare cu structura all-trans retinolului (fig.1.8).

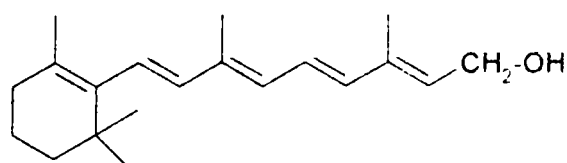


Fig. 1.8 Structura moleculară a all-trans retinolului

Retinolul este o vitamină adevărată deoarece nu poate fi sintetizată în organismul mamiferelor, unde ea poate ajunge prin intermediul alimentelor, mai ales sub formă de  $\beta$ -caroten. Formarea vitaminei A din  $\beta$ -caroten are loc în peretele intestinal sub acțiunea unei  $\beta$ -caroten-15,15'-dioxigenaze (carotenaza), cu participarea unei molecule de oxigen. Produsul primar al scindării oxidative<sup>48</sup> a  $\beta$ -carotenului este retinalul care poate fi redus la retinol și esterificat sau poate fi oxidat la acid retinoic (fig. 1.9). Retinolul se absoarbe prin intervenția unui

mecanism de transport activ caracteristic celulelor intestinale, proces facilitat de o proteină citosolică specifică CRBP II (cellular binding protein II).

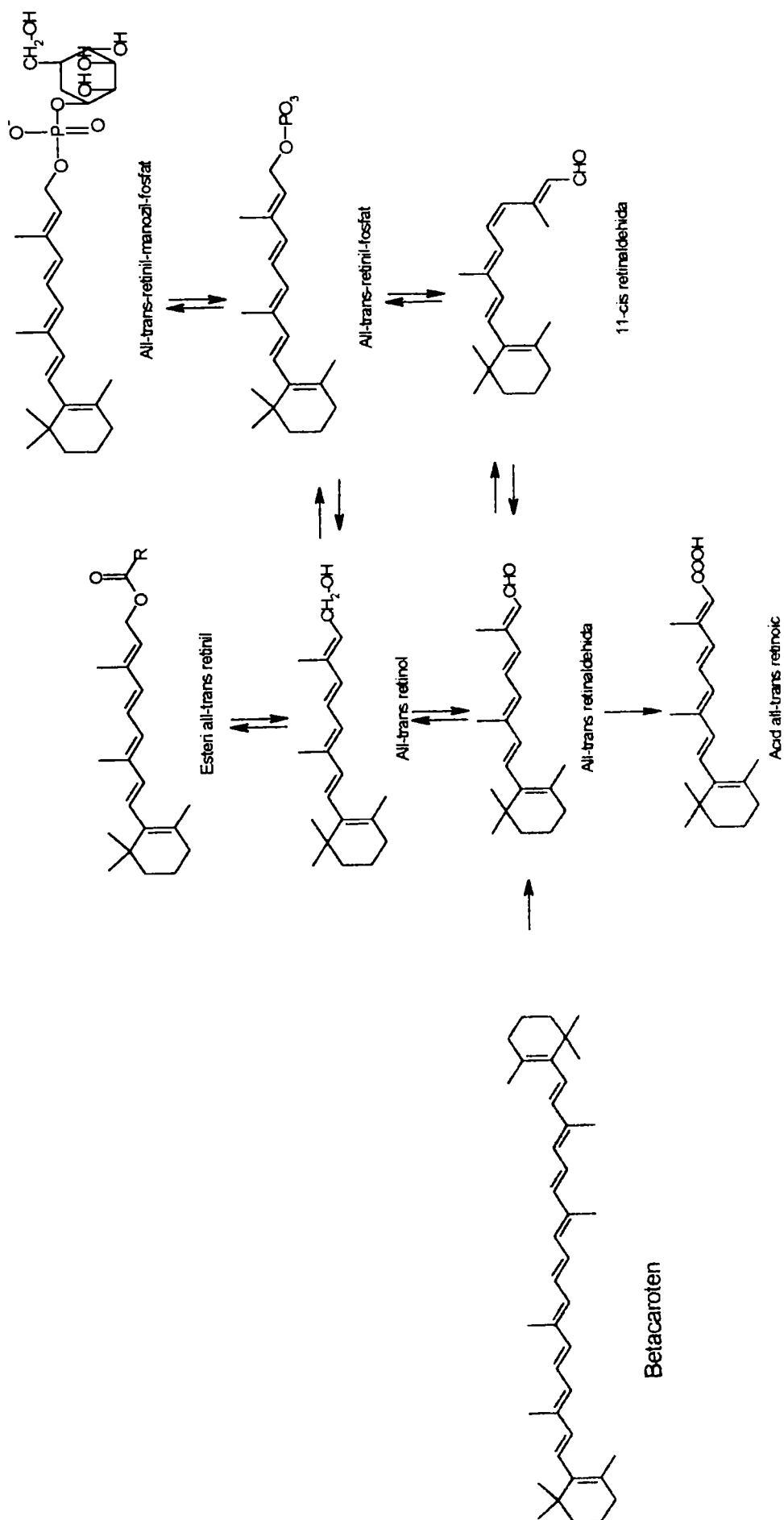


Fig. 1.9 Metabolismul vitaminei A

După traversarea peretelui intestinal, retinolul este esterificat mai ales cu acidul palmitic; esterii sunt încorporați în chilomicroni, iar pentru doze mari de retinol, în fracțiunea LDL a colesterolului; o mică parte din retinol trece direct în circulația generală.

Esterii retinolului<sup>49</sup> sunt captați de ficat, unde se acumulează, realizând concentrații mari cuprinse între 100 și 300  $\mu\text{g/g}$ . Depozitul hepatic este suficient pentru a menține, în condiții de carență, concentrații plasmatice mari timp de câteva luni.

Înainte de trecerea lor din ficat în circulația generală, esterii retinolului sunt hidrolizați. În plasmă, retinolul se leagă în proporție de peste 90% de un transportor specific denumit RBP (retinol binding protein) o  $\alpha_1$ -globulină, cu rolul de a transporta retinolul din depozitul hepatic la anumite țesuturi. Acest transportor numit și holo-RBP este sintetizat în ficat<sup>50</sup>, iar când este legat de retinol este puternic complexat cu o prealbumină denumită în prezent transtiretina (TTR).

Retinolul legat de RBP se fixează probabil de receptori specifici de pe membrana celulelor țintă<sup>49</sup> de unde este preluat și transferat intracelular de către o altă proteină, CRBP citosolic (proteina de fixare a retinolului din citoplasmă) cu rol în metabolismul și/sau funcția retinoidului<sup>51</sup>; este posibil ca proteina CRBP să medieze și transportul retinolului în nucleu. Complexul retinol-CRBP eliberează retinolul care apoi este transformat în compuși activi în funcție de tipul țesutului țintă: în retină se formează retinal și rodopsină, în țesutul epitelial se formează acid retinoic<sup>49</sup>.

Pe lângă reacțiile oxidative cu formare de retinaldehidă și respectiv acid retinoic, o altă cale de biotransformare cu posibile semnificații funcționale, este cea de fosforilare și apoi glicozilare în principal cu manoză, prezentată în fig. 1.9. Aceste reacții reprezintă din punct de vedere cantitativ, căi minore de metabolizare, iar semnificația lor este în prezent încă neelucidată.

Sub formă nemetabolizată, retinolul, retinaldehida sau esterii retinolului se elimină doar în cantități mici. Ei sunt în parte glucuronoconjugați în organism, formă sub care intră în circulația enterohepatică. Se elimină de asemenea prin urină și prin scaun.

Dintre proprietățile farmacologice atribuite vitaminei A (retinol), sunt mai importante cele legate mai ales de procesul vederii, funcția de reproducere, procesele de creștere și diferențiere a țesuturilor epiteliale.

O perioadă destul de îndelungată nu au fost disponibile modele biologice pentru evaluarea efectelor anticancerigene ale retinoizilor.

Unul dintre cele mai promițătoare modele a fost realizat de Bollag<sup>52</sup> prin inducerea chimică a papilomului la șoarece. În esență, papilomul este un epiteliom benign cu tendința de a degenera în carcinom al celulelor scuamoase și poate fi obținut prin aplicarea pe pielea de șoarece a unui inițiator 7,12-dimetil-benzantracen, urmată de un tratament repetat cu o substanță promotoare cancerigenă, uleiul de croton (principiul activ cu efect cancerigen al uleiului de croton este un ester de forbol). Utilizând protocolul de mai sus, carcinomul apare în decurs de 5 – 12 luni.

Studiile inițiale realizate pe modelul papilomului, cu vitamina A, au demonstrat faptul că retinolul previne atât inducerea papilomului și în același timp determină regresia papiloamelor formate. Utilizând vitamina A palmitat administrată oral în doză de 40 mg / kg corp / zi, Bollag<sup>52</sup> a obținut înjumătățirea volumului papiloamelor după un tratament de numai două săptămâni.

### **Retinaldehida**

Retinaldehida all-trans este disponibilă pentru organism din două surse: prin oxidarea retinolului de proveniență alimentară sau prin metabolizarea  $\beta$ -carotenului (fig. 1.9).

Conversia  $\beta$ -carotenilor în retinaldehidă este sub un control strict, astfel încât un aport excesiv de carotenoizi nu determină o hipervitaminoză A<sup>53</sup> cu manifestare clinică, deoarece retinaldehida odată formată poate fi redusă la retinol (de către enzimele hepatice și din mucoasa intestinală) care apoi se depozitează în ficat. Cantități mici pot fi oxidate la acid retinoic all-trans de către enzime din intestin, ficat și rinichi.

Retinaldehida all-trans este în mod deosebit importantă pentru funcționarea normală a ochiului, deoarece ea intervine direct în funcția retinei, deci în procesul vederii. Analizatorul vizual este locul unde retinaldehida all-trans poate fi izomerizată la 11-cis retinaldehidă ca parte a ciclului vizual<sup>49</sup> și reacția de izomerizare este prezentată în fig. 1.10:

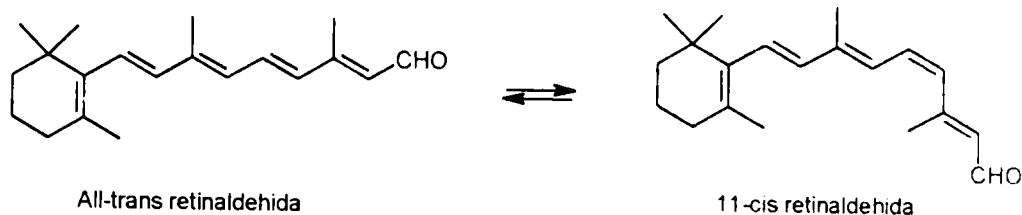


Fig. 1.10 Reacția de izomerizare a all-trans retinaldehidei la 11-cis retinaldehida

Retinalul intră în structura fotoreceptorilor din retină dispuși sub formă de conuri și bastonașe. În bastonașe se găsește rodopsina-un pigment fotosensibil (numit și purpura vizuală), iar în conuri se găsește iodopsina.

Rodopsina este sensibilă la trecerile de la lumină la întuneric și invers. Atât rodopsina, cât și iodopsina sunt din punct de vedere structural, heteroproteine cu același grup prostetic: 11-cis retinaldehida. Gruparea aldehidică este necesară pentru sinteza rodopsinei, prin formarea unei baze Schiff între 11-cis retinaldehidă și gruparea ε-aminică a lisinei<sup>54</sup>.

Oxidarea retinolului la retinaldehida se face sub acțiunea enzimei retinol-reductaza care are drept coenzimă NAD. Rodopsina se formează la întuneric, în celulele cu bastonașe din zona periferică a retinei, din 11-cis retinaldehidă și opsină (o lipoproteină specifică).

### Acidul retinoic all-trans (Tretinoin)

Acidul retinoic all-trans este un metabolit natural format din retinol și retinaldehidă (fig. 1.9). Concentrațiile fiziologice ale tretinoinului determinate de Chiang<sup>55</sup> au fost între 1-3 ng/ml, în timp ce De Leerheer<sup>56</sup> et al. au găsit valori între 2,7-4,2 ng/ml. Diferențele valorice găsite pot fi datorate instabilității chimice și fotochimice a retinoizilor ceea ce poate determina interconversia compușilor.

Astfel, tretinoinul poate fi izomerizat în unul dintre izomerii săi, inclusiv în acidul 13-cis-retinoic, sub acțiunea luminii ultraviolete<sup>56, 57</sup>. Derivații glucuronoconjugați ai acidului retinoic din plasmă sunt și ei instabili și se pot hidroliza la acidul corespunzător<sup>58</sup>. Structura moleculară a tretinoinului și a principalilor săi stereoisomeri este prezentată în fig. 1.18.

Spre deosebire de retinolul ingerat natural, alimentația umană<sup>59</sup> furnizează cantități relativ mici de acid retinoic all-trans. Pentru absorbția sa nu sunt

necesare mecanisme specifice, iar transportul acidului retinoic în circulația generală nu este mediat de proteine transportoare specifice<sup>60</sup>.

Deși acidul retinoic este foarte lipofil, transportul său se desfășoară aproape în întregime prin legarea sa de albumine plasmatice. Totuși, au fost identificate unele proteine specifice de legare, atât în membranele celulare, cât și în citosolul celular al diferitelor țesuturi, atât la animale, cât și la om<sup>51</sup>.

Acestea sunt denumite proteine celulare specifice de legare pentru acidul retinoic-CRABP (I și II). Ca și în cazul retinolului, ele funcționează probabil, ca transportori prin membranele celulare și este foarte posibil ca ele să medieze transferul acidului spre nucleu, unde s-a evidențiat existența unor receptori nucleari specifici de același tip cu cei pentru hormonii steroizi și hormonii tiroidieni, denumiți  $RAR_{\alpha}$ ,  $RAR_{\beta}$  și  $RAR_{\gamma}$ . Complexul acid retinoic--receptor acționează asupra ADN, reglând procesul de transcripție nucleară.

Există dovezi experimentale care atestă că nivelele de CRABP sunt crescute, atât în țesuturile psoriatică, cât și în cele canceroase<sup>61</sup>.

Acidul retinoic nu este reținut în organism, ci este eliminat rapid prin metabolizare. Metabolismul acidului retinoic all-trans<sup>48</sup> este prezentat în fig. 1.11.

Date farmacologice indică de asemenea faptul că acidul retinoic nu poate fi readus la forme active de retinaldehidă și retinol deoarece, în timp ce acidul poate influența procesul de creștere la mamifere cu hipovitaminoză A, el nu poate fi un substituent pentru funcția de reproducere sau pentru procesul vederii.

Unele căi metabolice dau totuși naștere la compuși care păstrează activitatea retinoid-like, ca de exemplu izomerizarea reversibilă la analogul său acidul 13-cis retinoic (izotretinoin). Dintre metaboliții săi,  $\beta$ -glucuronid conjugatul acidului retinoic all-trans este la fel de activ ca și acidul din care provine. Acest metabolit a fost identificat<sup>62</sup> în numeroase țesuturi, inclusiv în ficat și în epitelul intestinal. Acțiunea sa, ar putea fi datorată unei hidrolize chimice sau biochimice cu refacerea acidului retinoic, situație în care formarea metabolitului ar putea fi considerată ca o dezactivare metabolică<sup>58</sup>

Eliminarea ulterioară a conjugatului prin secreție tubulară, prin epitelul intestinal sau prin bilă<sup>63</sup>, ar putea face posibilă apoi integrarea sa în circuitul enterohepatic.

Importanța acestei căi metabolice este relativă; astfel, în studii efectuate la șobolani<sup>64</sup> și respectiv la câini<sup>65</sup>, s-a evidențiat doar o mică proporție astfel metabolizată, în timp ce studiul lui Zile<sup>63</sup> et al. a identificat în bila șoarecilor peste 10% din doza administrată sub formă de acid retinoic liber sau conjugat.

Prin studiile efectuate până în prezent, semnificația acestei căi metabolice nu a fost încă complet elucidată.

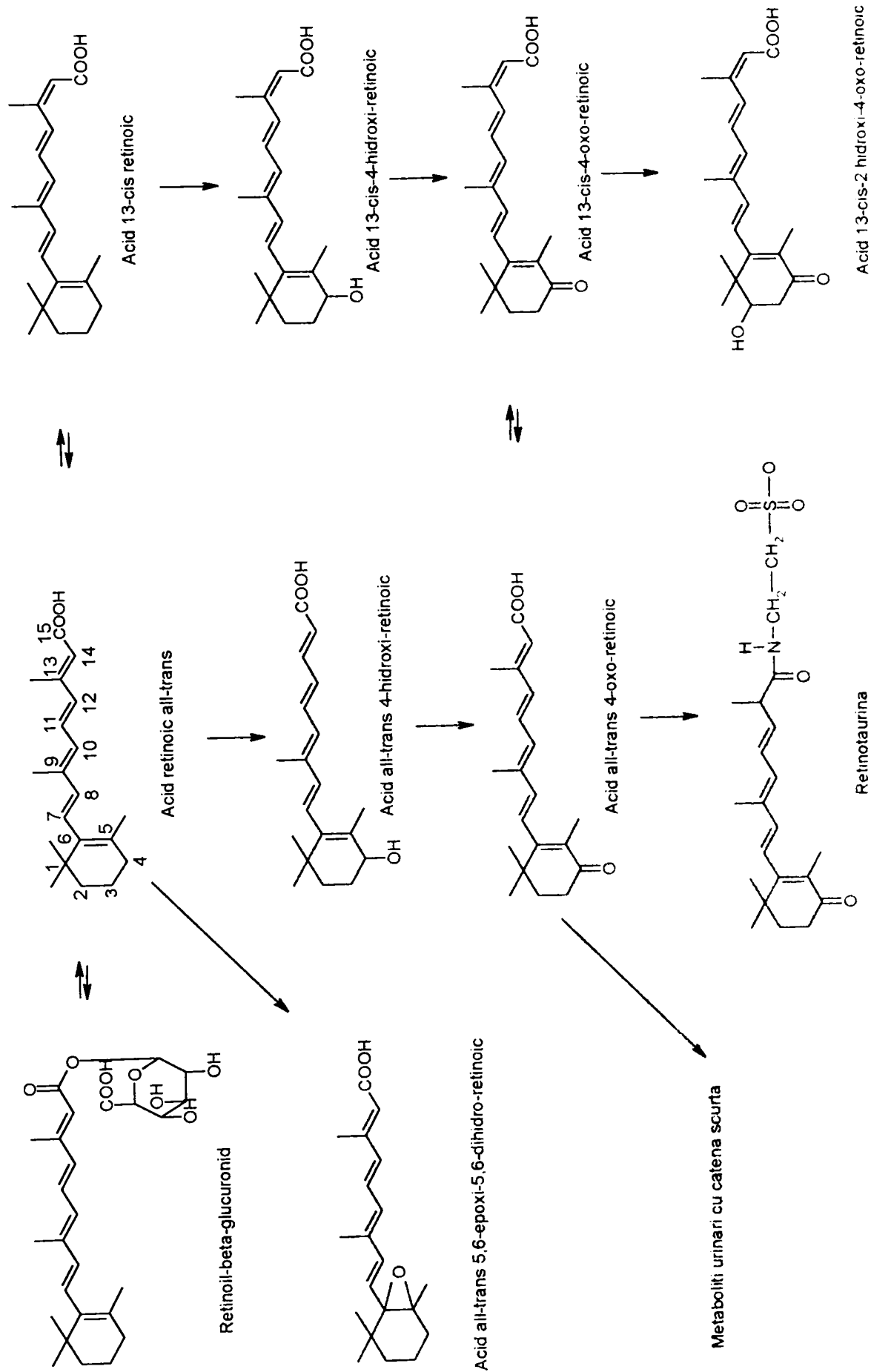


Fig. 1.11 Metabolismul acidului retinoic all-trans



Majoritatea căilor de metabolizare a tretinoinului (fig. 1.11) conduc la o pierdere a activității retinoid-like, iar cele trei reacții mai importante sunt:

- a) O parte a acidului retinoic este conjugată cu taurină, iar compușii conjugați sunt apoi eliminați prin bilă;
- b) Hidroxilarea la C<sub>4</sub> din inelul ciclohexenil, urmată de oxidare la o 4-cetonă care poate fi apoi eliminată prin bilă și urină după o ulterioară reacție de hidroxilare și/sau conjugare; este probabil cea mai importantă reacție de inactivare;
- c) Reacții de decarboxilare care conduc la pierderea secvențială a două unități de C din lanțul polienic conjugat.

Spre deosebire de retinol, diferiții acizi retinoici, rezultați prin metabolizarea acidului retinoic all-trans, nu sunt reținuți în depozitele tisulare și, ca urmare, sunt eliminați<sup>66</sup> rapid din organism. În urină nu s-au putut determina decât metaboliți, iar în bilă numai cantități mici de acid liber<sup>67</sup>.

Studii cu acid retinoic marcat radioactiv<sup>63, 64</sup>, au indicat că bila este calea principală de eliminare a metaboliților acidului retinoic all-trans.

Studii realizate la mamifere, au indicat faptul că, proporția relativă a metaboliților acidului retinoic all-trans, depinde și de doza administrată. Astfel, Roberts și Frolik<sup>68</sup> au demonstrat că raportul de metabolizare a izomerului 13-cis (izotretinoin) în 4-oxo-acid retinoic, format în experimente efectuate pe țesuturi, in vitro, scade cu creșterea dozei de tretinoin administrat.

Studii de farmacocinetică similare, cu tretinoin la om, sunt puține. S-a administrat o doză unică de 0,5 mg intravenos la un voluntar, ca doză de control pentru un studiu de absorbție topică. După administrarea intravenoasă, concentrațiile plasmatiche determinate<sup>55</sup> la 5 minute respectiv 1 oră, au avut valorile de 14,6 și respectiv 5,4 ng/ml. Pe baza acestor date, s-a estimat ulterior volumul de distribuție<sup>69</sup> pentru tretinoin la om ca fiind de aproximativ 30 l.

După aplicare topică<sup>55</sup>, nivelele de tretinoin au fost raportate ca nefiind măsurabile (< 2 ng/ml), chiar după un interval de 28 de zile de aplicare continuă a unei creme 0,025% pe brațe și pe picioare și, de asemenea, nici după o aplicare unică pe întregul corp a unei creme 1%.

## Acțiunea farmacologică a acidului retinoic pe tegument

Acidul retinoic all-trans (tretinoin), deși posedă multe din acțiunile farmacologice ale vitaminei A, este în prezent indicat mai ales pentru tratamente locale în acnee<sup>70</sup>, datorită acțiunii comedolitice și sebostatice, dar și în psoriazis, o afecțiune hiperproliferativă.

Utilizarea acidului retinoic all-trans pe cale orală este limitată de efectele sale secundare de tip hipervitaminoză, care pot apărea chiar și după administrarea unor doze terapeutice.

Unul dintre cele mai cunoscute efecte produse prin aplicarea topică a retinoizilor de tipul tretinoinului este hiperplazia epidermei. Ipoteza că hiperplazia epidermei ar fi mediată de receptorul de tip RAR (receptor specific pentru acidul retinoic) este susținută și de faptul că un antagonist specific al acestui tip de receptor, cu denumirea AGH 193109, se fixează pe receptorii RAR cu o afinitate comparabilă cu a tretinoinului, dar nu induce și transcripția genică în experimentul pe culturi celulare<sup>71</sup>.

Utilizarea tretinoinului ca preparat topic este limitată de efectul său iritant local al pielii. Pe baza asemănărilor cu unele substanțe iritante ale pielii, se poate face presupunerea că hiperplazia epidermei indusă de tretinoin, ar putea fi rezultatul unor efecte nespecifice, independente de fixarea pe receptori<sup>72</sup>. Pe de altă parte, discontinuitatea fizică a epidermului poate explica, în viziunea lui Proksch et al.<sup>73</sup>, efectul iritanților nespecifici în inducerea hiperplaziei epidermei. Thacher et al.<sup>74</sup>, au constatat o bună corelare între hiperplazia retinoid-indusă și iritația locală produsă de retinoid.

Investigații recente au evidențiat rolul benefic al acidului retinoic all-trans, aplicat topic, în profilaxia îmbătrânirii pielii datorită radiațiilor solare (în special UVB), acțiune cunoscută sub numele de „anti-foto-aging-effect”.

Acidul retinoic, după aplicare topică, timp de 10 săptămâni, la șoareci fără păr, a stimulat depunerea unui strat subepidermic de colagen<sup>75</sup>, gros de aproximativ 100  $\mu$  și creșterea proporției colagenului<sup>76</sup> de tip I.

Acidul retinoic și-a demonstrat utilitatea ca agent de chemoprevenție sau de chemoterapie anticanceroasă. Cele mai recente studii clinice au demonstrat efectul său benefic în anumite forme de cancer, și mai ales în keratozele actinice. Mecanismul efectului anticanceros nu a fost încă precizat. Acidul retinoic nu are proprietăți citostatice. El favorizează transformarea celulelor maligne, prin diferențiere, în celule normale, efectul fiind atribuit intervenției sale reglatoare în sinteza proteinelor (fibronectina) și glicoproteinelor.

De asemenea, acidul retinoic prezintă și o acțiune melanotropă<sup>77</sup>, fiind util în tratamentul unor boli de hiperpigmentare (melasmă).

Tretinoinul acționează prin activarea unor factori de creștere<sup>78</sup>, asupra fazei anagene a foliculului pilos, determinând acțiunea de morfogeneză și de creștere a părului.

### **Acidul 13-cis-retinoic (izotretinoin)**

Acidul 13-cis retinoic (izotretinoin, Roaccutane®), este singurul retinoid sintetic din prima generație, utilizat clinic în administrare sistemică în cazuri severe de acnee, ca de exemplu acnee chistică severă<sup>79</sup>, dar și în pitiriazis rubra pilaris<sup>80</sup>, în boala lui Darier<sup>81</sup> și în keratoza palmară<sup>82</sup>.

Studiile privind absorbția orală a izotretinoinului la om, au fost efectuate cu doze unice pe voluntari, în inaniție. Variațiile destul de semnificative, s-ar putea explica și prin diferențele între formele de administrare: Roaccutane®, capsule gelatinoase, față de studiile de început, în care izotretinoinul era administrat ca suspensie. Astfel, peak-ul concentrației sanguine, după o doză unică de 80 mg izotretinoin în suspensie, a fost găsit de 436-950 ng/ml la 1-3 ore după administrare<sup>82</sup>, în timp ce, după administrarea a 100 mg sub formă de capsulă, concentrațiile maxime de 74-511 ng/ml au fost determinate după 2-4 ore<sup>82</sup>. Pentru a studia modul în care variază absorbția orală în funcție de doză, s-au administrat doze de 80,160,240 și 320 mg izotretinoin în capsule gelatinoase, folosind o schemă de tratament de tip încrucișare („cross-over”). Atât concentrațiile maxime, cât și ASC-ul (aria de sub curba concentrației plasmatică a medicamentului în funcție de timp), au fost dependente de doza administrată până la valoarea de 240 mg, după care nu au mai crescut. Toate dozele au fost eliminate cu un  $T_{1/2}$  mediu între 13,5 și 16,5 ore. Din cauza efectului teratogen al izotretinoinului, dozele mari<sup>82</sup> nu pot fi utilizate pentru tratamentul în acnee.

Acumularea medicamentului (cinetica dozelor multiple) s-a studiat pe pacienții cu acnee chistică<sup>83</sup>, cărora li s-a administrat oral Roaccutane®, capsule, inițial 80 mg, apoi 40 mg/zi timp de 25 de zile și o doză finală de 80 mg. Prima și ultima doză au fost luate în condiții de inaniție. Valorile obținute pentru concentrațiile plasmatiche maxime, ASC și pentru  $T_{1/2}$ , în cazul studiului cu doze multiple, au sugerat că nu există modificări semnificative de farmacocinetică în timpul administrării repetate. Experimentul confirmă stabilirea unei concentrații plasmatiche constante („steady-state”) după 5-7 zile de tratament

și numai o mică acumulare a medicamentului. Rezultatele acestui studiu<sup>84</sup> contrastează cu datele obținute anterior la un grup de pacienți cu cancer, cărora li s-au administrat doze mari (3 mg/kg corp/zi) și care au prezentat o creștere de 3 ori a  $C_{max}$  și ASC-ului în timpul tratamentului de 12 zile. Diferența ar putea indica faptul că, izotretinoinul este eliminat mai lent la bolnavii cronici (studii cu privire la efectele asupra funcției renale, hepatice și studii cu privire la influența vârstei asupra farmacocineticii izotretinoinului, nu s-au realizat până în prezent).

Ca și alți retinoizi, izotretinoinul este foarte lipofil, ca urmare, în circulația sistemică este puternic legat de proteinele plasmatică, aproape exclusiv de albumine. Există puține date în literatură, referitoare la determinarea concentrației izotretinoinului în piele, la pacienți cu acnee nodulo-chistică. Studii la șoareci, cărora li s-a administrat medicamentul intravenos, indică concentrații tisulare în general mai scăzute comparativ cu cele plasmatică, în consecință, nu există nici o dovadă care să sugereze depozitarea specifică într-un anumit organ<sup>85</sup>.

Metabolismul izotretinoinului este legat de cel al izomerului all-trans, deoarece, cei doi compuși sunt interconverși *in vivo*<sup>84, 86, 87</sup>, 20-30% din doza administrată, fiind metabolizată pe această cale. Deoarece interconversia poate fi catalizată de lumină, probele obținute din aceste studii se vor proteja cu multă atenție<sup>57</sup>.

Dintre metaboliți, 4-oxo-derivatul (acidul 4-oxo-13-cis-retinoic) se acumulează după o administrare continuă și determină concentrații constante în circulația sistemică de 2-5 ori mai mari decât ale medicamentului netransformat, dar are un volum de distribuție mai mic decât al izotretinoinului<sup>83</sup>. Alți metaboliți presupuși, dar încă neidentificați, includ probabil derivați glucuronoconjugați

Studiile inițiale cu privire la excreția izotretinoinului nemarcat, au indicat că după administrarea orală, cantități neglijabile de izotretinoin neconjugaat au fost identificate în urină, iar 53-74% s-a eliminat nemodificat prin scaun<sup>87</sup>. Activitatea enzimelor hepatice metabolizante ale izotretinoinului nu este influențată de acesta. Cel mai lung  $T_{1/2}$  pentru izotretinoin, la pacienți cu acnee, după tratament cu Roaccutane®, este de aproximativ 24 ore. Pe această bază, eliminarea medicamentului ar trebui să fie completă în 7 zile de la întreruperea tratamentului<sup>83</sup>. Mai mulți metaboliți ai izotretinoinului, sunt totuși eliminați mai lent decât compusul de bază; din acest motiv, se recomandă menținerea contracepției efective pe durata a cel puțin unui ciclu menstrual după oprirea tratamentului, în cazul în care este tratată cu izotretinoin o femeie a cărei vârstă face posibilă apariția unei sarcini.

## Acțiune farmacologică a izotretinoinului

Acneea apare ca o consecință a funcției anormale a glandelor sebacee și există câteva modalități prin care retinoizii își exercită acțiunea lor benefică:

- ✓ Scad producția și implicit secreția de sebum;
- ✓ Modifică compoziția lipidelor de la suprafața tegumentului;
- ✓ Scad proliferarea *Propionibacterium acnes*;
- ✓ Previn keratinizarea foliculară anormală.

Caracteristica esențială pentru a distinge acneea de alte dermatoze, este o secreție sebacee crescută, creând un mediu ideal pentru proliferarea *Propionibacterium acnes*.

O metodă simplă de a stimula secreția de sebum la animale, o constituie administrarea de testosteron la șobolani sau hamsteri imaturi, deoarece diferențierea glandei sebacee într-o glandă funcțională, matură, este dependentă de prezența hormonilor androgeni<sup>88</sup>.

Această stimulare a producției de sebum este blocată de mai multe substanțe, incluzând acidul 13-cis retinoic, antiandrogeni și estrogeni.

Datele din literatură, arată că exacerbarea dezvoltării și activității secretorii ale glandelor sebacee sunt factori esențiali în formarea leziunilor inflamatorii din acneea.

S-a demonstrat că acidul 13-cis retinoic, după o terapie de 3 săptămâni, la pacienți cu acneea nodulo-chistică, scade secreția de sebum<sup>89</sup> cu 86%.

Specificitatea acidului 13-cis retinoic în acțiunea împotriva glandelor sebacee, poate fi demonstrată prin modelul organului de flanc al hamsterului<sup>90</sup>. Organul de flanc are glande sebacee, celule dermice pigmentate și foliculi piloși pigmentați mari, care sunt androgen-sensibili. Orice antiandrogeni vor afecta toate cele trei tipuri celulare. Tratamentul organelor de flanc ale hamsterilor masculi, maturi, cu acid 13-cis retinoic, subcutanat (2 injecții/săptămână, timp de trei săptămâni), a determinat o reducere marcată a dimensiunii glandelor sebacee, fără a afecta celelalte tipuri celulare. S-a semnalat și o diminuare a creșterii glandelor sebacee<sup>90</sup>.

### **Studii in vivo. Comedogeneza**

Obstrucția orificiului folicular al glandei sebacee, împiedică conținutul său să ajungă la suprafața pielii. Aceasta determină acumularea de lipide în ductul folicular, fapt care poate provoca formarea de comedoane. Comedoanele sunt rezultatul unor modificări complexe în diferențierea celulelor epiteliale situate de-a lungul ductului foliculului glandei sebacee<sup>82</sup>. Una dintre cele mai importante schimbări, este apariția unui strat cornos, hipertrofiat, datorită celulelor acestui strat care suferă o keratinizare terminală anormală. Celulele prezintă pereți îngroșați și sunt strâns alipite. Uneori, celulele pot forma un "dop" comedonal care comprimă straturile de celule anormale keratinizate, constituind o masă compactă în care se găsesc dispersate sebum și bacteriile (*Propionibacterium acnes*) care proliferază.

Unele dintre caracterele comedogenezei umane pot fi redată pe modele de animale sensibile la acțiunea retinoizilor ca: modelul urechii de iepure sau modelul de șoarece rhino (șoareci mutanți fără păr). În modelul urechii de iepure, glandele sebacee mari, sunt badijonate cu gudron de cărbune ("coal tar") care produce o hiperkeratinizare după 5 săptămâni<sup>91</sup>. Aplicarea locală a retinoizilor a redus semnificativ numărul de comedoane<sup>92</sup>; astfel, acidul retinoic all-trans a produs o reducere (dependentă de zonă) a numărului de comedoane induse de gudronul de cărbune la o valoare a DE<sub>50</sub> de 0,02% (0,5 ml aplicat local de 5 ori pe săptămână, timp de 2 săptămâni).

Modelul pe șoareci rhino (mutanți fără păr) prezintă următoarele caracteristici<sup>93</sup>: foliculii sebacei din pielea acestor animale sunt distanțați de stratul cornos excesiv și la deschiderea ductului la suprafața pielii, vârfulurile acestor dopuri foliculare keratinizate sunt pigmentate brun-închis. Deși grosier, aceste structuri seamănă cu comedoanele deschise umane, însă ele nu conțin *Propionibacterium acnes* și nici dopul folicular nu poate fi eliminat prin presiune. Pielea devine progresiv zbârcită astfel încât, la șoarecii adulți atârână în cute largi. Pe acest model, au fost evaluați pentru activitate antikeratinizantă<sup>92, 93</sup> un număr important de retinoizi. Dintre aceștia, acidul retinoic all-trans a refăcut structura neobișnuită a pielii șoarecelui rhino la un aspect aproape normal. În mare parte,

pielea tratată devine la fel de netedă ca și la șoarecele alelic fără păr, iar pliurile și cutele suplimentare ale pielii au dispărut aproape complet.

Efectul cutanat al retinoizilor se poate cuantifica prin măsurarea diametrului utriculului<sup>92</sup> în întregul epiderm din pielea șoarecelui rhino. Astfel, dacă la șoareci rhino netratați diametrul utriculului variază între 175-206  $\mu\text{m}$ , după tratamentul cu acid retinoic all-trans și 13-cis, atât oral, cât și local, s-au produs reduceri dependente de doză ale diametrului acestuia. S-a constatat că acidul retinoic all-trans este evident mai eficace în aplicarea topică, decât acidul 13-cis retinoic.

Prin modelul organului de flanc<sup>90</sup> al hamsterului poate fi demonstrată acțiunea specifică a acidului 13-cis retinoic asupra glandelor sebacee.

### Studii in vitro

Efectele principale ale acidului all-trans și 13-cis retinoic, la om și la animale de experiență determină o diminuare a keratinizării și o reducere a secreției de sebum.

Sisteme celulare sensibile, specifice pentru retinoizi sunt: culturile de celule epidermice din tegumentul de șoarece și culturi celulare de organ traheal de hamster cu hipovitaminoză A. În ambele cazuri adaosul de vitamină A în cultura celulară a determinat o creștere marcată a ARN-ului celular și o scădere a producției de keratină.

Acidul retinoic all-trans are o valoare a  $DE_{50}$ , ca reversor al keratinizării, de  $3 \times 10^{-10}$  M, iar pentru efectul său de stimulare a ARN-ului epitelial, de  $4 \times 10^{-10}$  M. În ceea ce privește potența efectului biologic, acidul retinoic all-trans<sup>94</sup> este de cel puțin 10 ori mai puternic decât vitamina A.

În general retinoizii intensifică proliferarea și descuamarea celulelor epidermice de cultură și pot inhiba diferențierea. O concentrație de  $10^{-6}$  M de acid retinoic determină stratificarea celulelor epidermice umane, dar nu se mai formează stratul granulos și cornos ca în cazul epidermului normal. Este afectată de retinoizi, atât formarea filagrinei, cât și formarea unor componente ale desmozomilor<sup>95</sup>.

Efectele retinoizilor la nivelul biosintezei keratinei au fost studiate<sup>96</sup> pe culturi de celula epiteliale de bronhii umane.

Cele mai puternice efecte ale retinoizilor constau în inhibarea sintezei keratin-proteinelor cu G.M. de 48000 și respectiv 50000 (citokeratinele 16 și

respectiv 14), precum și stimularea sintezei proteinelor cu G.M. de 40000 și respectiv 52000-54000. Modificarea sintezei keratinelor poate fi blocată prin actinomicina D, indicând faptul că retinoizii afectează această sinteză prin controlul transcripției nucleare<sup>82</sup>.

Retinoizii influențează de asemenea, biosinteza componentelor matricei extracelulare; în culturi de keratinocite de iepure acidul retinoic all-trans a produs o creștere semnificativă a sintezei de fibronectină<sup>97</sup>.

O proteină epitelială sensibilă în mod special la retinoizi este ornitindecarboxilaza. Sinteza ei în celulele epiteliului traheal de șobolan este indusă<sup>98</sup> de către esterii de forbol după 3-5 ore și aproape complet blocată de acidul retinoic all-trans  $10^{-8}$  M.

În modelul realizat pe culturi de fibroblaști umani tratați cu acid retinoic all-trans, Daly și Weston<sup>99</sup> au evidențiat o scădere a proliferării fibroblaștilor, dar și o creștere a sintezei de colagen. Modificarea sintezei de colagen este însoțită de o diminuare a producerii colagenazei<sup>100</sup>; întrucât această enzimă este esențială în clivarea colagenului se poate face presupunerea că ar putea fi influențată și clivarea colagenului extracelular.

### **1.2.2. Retinoizi din generația a 2-a**

#### **Etretinate (Tigason®)**

Etretinatul a fost selecționat dintre aproximativ 1500 retinoizi sintetici evaluați de firma Hoffman La Roche. Cea mai importantă caracteristică a acidului 13-cis retinoic și a etretinatlui este faptul că ei au, comparativ cu acidul retinoic all-trans, indici terapeutici superiori. Îmbunătățirea a fost apreciată printr-o creștere a potenței etretinatlui în modelul antipapilom, fără o creștere corespunzătoare a hipervitaminozei A. Aceasta, a sugerat posibilitatea separării diferitelor acțiuni ale retinoizilor pentru obținerea unei specificități mărite. Comparând efectele farmacologice ale etretinatlui cu ale acidului 13-cis retinoic, distingem următoarea diferență: etretinatul este relativ mai puțin activ în suprimarea secreției de sebum, în timp ce acidul 13-cis retinoic este mult mai eficace din acest punct de vedere.

Etretinatul produce diminuarea semnificativă a hiperkeratinizării pe o varietate de modele, in vivo și in vitro; o caracteristică suplimentară a profilului farmacologic al etretinatlui este acțiunea sa imunomodulatoare marcată. Astfel,



pe un model de hipersensibilitate<sup>101</sup> de tip întârziat la șoareci, s-a arătat că etretinatul este de cel puțin 3 ori mai puternic decât acidul 13-cis retinoic în inhibarea reacției de hipersensibilitate. Etretinatul inhibă hipersensibilitatea de tip întârziat când este administrat în timpul sensibilizării la antigen, dar nu mai este eficient dacă este administrat în momentul provocării antigenice<sup>102</sup>. Această acțiune este produsă probabil ca rezultat al sensibilizării scăzute a limfocitelor T-helper la antigen. În psoriazis, etretinatul a redus citotoxicitatea anticorpo-dependentă mediată celular<sup>103</sup>, indicând că imunomodularea poate fi o componentă importantă a acțiunii sale terapeutice.

Observația că retinoizii pot afecta sistemul imun, oferă speranța că viitoarele generații de retinoizi vor putea fi sintetizate cu efecte benefice în bolile autoimune.

### **Farmacocinetica etretinatului**

Administrarea intravenoasă a unei doze unice de 10 mg etretinat <sup>3</sup>H, la 5 voluntari, a determinat obținerea unui nivel plasmatic inițial de 600 ng/ml care a scăzut rapid după 12-24 ore de la administrare la numai 5 ng/ml. Concentrațiile metabolitului primar, acitretin<sup>104</sup>, au atins un maxim la aproximativ 2 ore de la administrare, iar apoi au scăzut cu o viteză similară cu a concentrației medicamentului netransformat. Un alt studiu<sup>104</sup>, s-a realizat prin administrarea unei doze unice orale de 100 mg etretinat nemarcat (4 capsule de 25 mg): medicamentul a fost rapid absorbit pentru a ajunge apoi la o concentrație maximă între 400-600 ng/ml plasmă după 2-3 ore. Nivelul a scăzut apoi exponențial cu un  $T_{1/2}$  aparent de 7-9 ore. Comparând valorile ASC cu cele de la administrarea intravenoasă, s-a obținut o biodisponibilitate medie  $\pm$  SEM de  $44 \pm 14\%$  (între 30-70%).

Concentrațiile plasmatice ale etretinatului sunt mai mari când doza este administrată împreună cu lapte sau alimente grase, indicând posibilitatea ca absorbția orală a etretinatului să fie mediată de către vasele limfatice mai mult decât de către sistemul portal<sup>105</sup>. De asemenea, este posibil ca variațiile plasmatice relativ mari din studii, să se datoreze unor diferențe individuale în distribuția medicamentului.

În administrare pe termen lung, atât etretinatul, cât și metaboliții săi activi, se acumulează într-un grad neașteptat de mare. Astfel, un studiu realizat de Paravicini<sup>104</sup> et al., a arătat că după două săptămâni de administrare orală

continuă la voluntari, etretinatul a putut fi detectat în plasmă timp de mai mult de 7 zile după administrare, iar  $T_{1,2}$  aparent era acum de 4-8 zile. Acumularea neașteptată, urmată de o eliminare lentă, a fost de asemenea observată la pacienții psoriatici cărora li s-a administrat o doză de 25 mg timp de 10 zile, precum și la pacienți cu boala Darier<sup>106</sup> care au fost tratați cu etretinat timp de șase săptămâni. O eliminare chiar mai lentă a fost observată la pacienții tratați până la un an, ale căror probe plasmatice conțineau concentrații substanțiale, atât de etretinat, cât și de metabolit, la 140 zile după întreruperea tratamentului, estimându-se că ambii compuși (etretinat și acitretin) au un  $T_{1,2}$  de 60-90 zile.

Acumularea etretinatului în timpul terapiei, este explicată de Paravicini<sup>104</sup> et al., prin aceea că o mică proporție din fiecare doză este reținută într-un „compartiment profund”, de unde se elimină lent. Studii inițiale pe animalele de laborator, au indicat că, la fel ca și în cazul retinolului, etretinatul poate fi preluat și stocat în ficat; de exemplu, la șobolanii tratați cu o doză unică, fixarea<sup>107</sup> reprezintă 16% din doza administrată. La pacienții psoriatici, concentrația în probele de biopsie hepatică a fost aproape identică cu cea plasmatică, ulterior demonstrându-se că depozitarea a avut loc în principal în țesutul adipos. S-a evidențiat de asemenea, că după o lună de terapie, concentrațiile de etretinat<sup>108</sup> determinate în grăsimea subcutanată sunt de aproximativ 20 de ori mai mari decât cele din epiderm și derm.

Întreruperea tratamentului a determinat eliminarea rapidă a medicamentului din țesutul epidermic, în paralel cu dispariția efectelor secundare cutanate. Eliminarea etretinatului din grăsimea subcutană s-a produs mult mai lent și etretinatul a putut fi detectat încă 18 luni. Date suplimentare, că țesutul adipos este, de fapt, „compartimentul profund”, au fost furnizate de analize pe probe de autopsie<sup>109</sup>. La autopsie, nivelele metabolitului primar (acitretin), în toate organele au fost mai mici decât cele ale etretinatului, încă o dovadă că cinetica acestui compus este limitată de viteza de formare. În același studiu<sup>109</sup>, concentrațiile izomerului 13-cis acitretin, se ridicau la mai puțin de 10% din valorile corespunzătoare pentru acitretin.

Căile metabolice pentru etretinat sunt considerate a fi următoarele:

- ✓ dezesterificare la acitretin, urmată de izomerizare la 13-cis acitretin și/sau conjugarea grupării -COOH libere;
- ✓ demetilarea grupei metoxi atașată de inelul aril;
- ✓ degradarea oxidativă a catenei polienice.

Până în prezent, singurii metaboliți identificați în plasma umană sunt acitretin și 13-cis-acitretin (fig. 1.12), iar în urină au fost izolați și identificați 18 metaboliți.

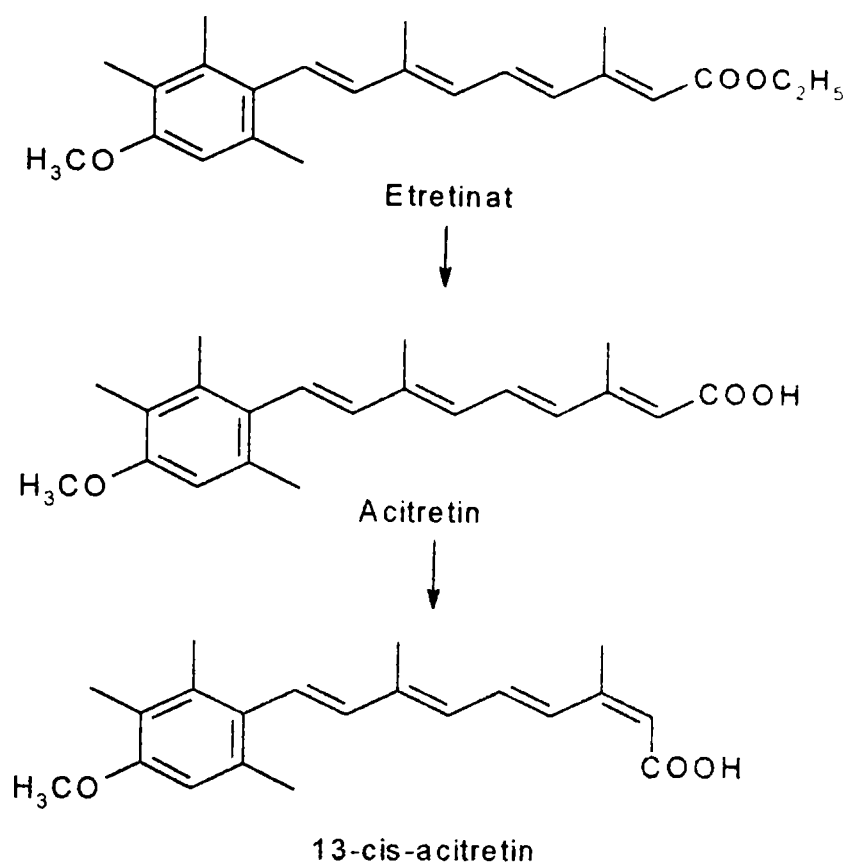


Fig. 1.12 Structura moleculară a etretinatului și a metaboliților săi

Hani<sup>110</sup> et al. au determinat că excreția unei doze unice de etretinat marcat la pacienții psoriatici se face în proporție de 90% în 8 zile, din care 15% pe cale urinară și 75% prin scaun. Prin urină nu se elimină medicamentul netransformat, dar în scaun etretinatul netransformat a fost componentul major.

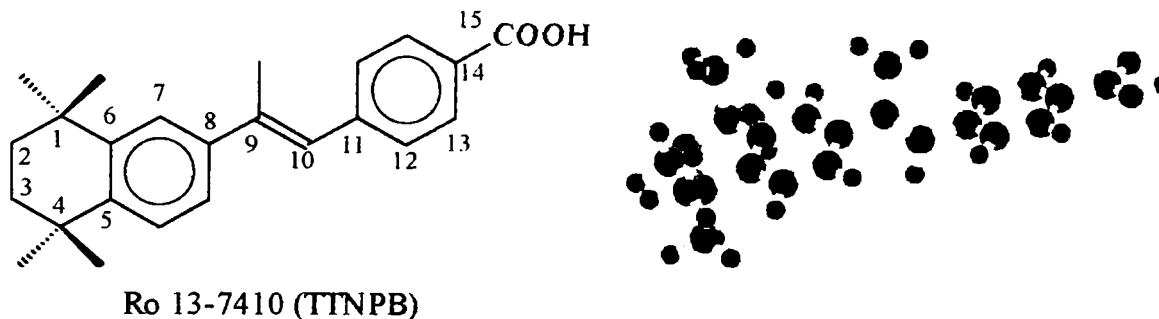
Acumularea posibilă a etretinatului în țesutul adipos nu are aparent o consecință toxică directă, deoarece această legare este nespecifică și nesaturabilă. Toxicitatea ar putea să apară doar dacă întreaga cantitate de medicament stocat este eliberată într-o perioadă foarte scurtă de timp.

Necesitatea supravegherii prelungite a pacientelor tratate cu Tigason®, constituie o complicație a tratamentului cu acest medicament; principalul compus de alternativă îl reprezintă metabolitul său primar activ, și anume acitretinul. Rezultatele obținute indică faptul că acest compus constituie un tratament eficient în psoriazis.

### 1.2.3. Retinoizi din generația a 3-a

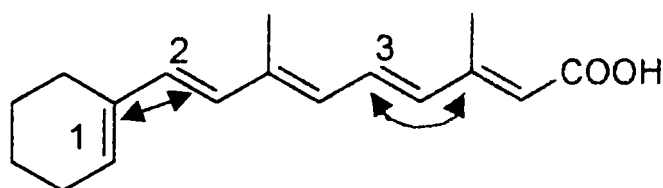
Încă de la începutul anilor 1980, s-a realizat dezideratul de a obține prin sinteză, o structură derivată din cea a acidului retinoic all-trans, dar având o potență mult mai mare.

Primul compus important al acestei clase a fost sintetizat în 1980 și el este un analog al acidului retinoic all-trans<sup>111</sup>, fiind de 300-1000 de ori mai activ decât acesta; este vorba despre acidul (E)-4-(5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftenil-1-propenil)-benzoic, denumit și TTNPB sau Ro 13-7410, cu structura clasică și respectiv geometria lui optimizată<sup>112</sup> cu MM+ și AMI prezentate în fig. 1.13:



*Fig. 1.13 Structura clasică a arotinoidului TTNPB și geometria lui optimizată cu MM+ și AMI*

Acest analog poate fi considerat, ca și alți compuși sintetizați ulterior, un derivat al acidului retinoic all-trans cu conformație restrictată în care mobilitatea catenei polienice flexibile a fost restrictată prin încorporarea a 4 duble legături în cicluri aromatice; noile legături formate, pentru compusul TTNPB pot fi reprezentate schematic astfel (fig. 1.14):



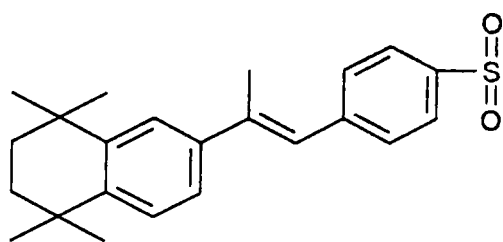
*Fig. 1.14 Reprezentarea schematică a noilor legături formate în compusul TTNPB*

Noua clasă de retinoizi obținută prin modificarea structurii acidului retinoic all-trans în acest mod, a fost denumită de Bollag<sup>113</sup>, clasa arotinoizilor.

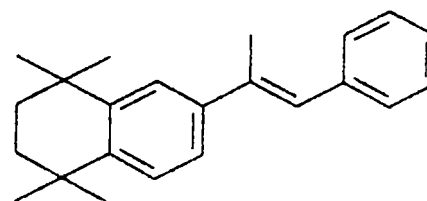
Eficiența biologică a compusului TTNPB, a fost demonstrată pe modele experimentale (teste pe culturi celulare sau de organe izolate-trahee), DE<sub>50</sub> fiind

mult mai mici, comparativ cu toate celelalte clase de retinoizi testate în același mod<sup>114</sup>, iar esterul compusului TTNPB a fost evaluat cu bune rezultate în experimente clinice, în tratamentul unor afecțiuni dermatologice la om. Utilizând valori experimentale din literatură referitoare la activitatea biologică<sup>115,116,117,118</sup> a unei serii de retinoizi și de analogi ai acestora din care TTNPB este cel mai activ (în inhibarea cheratinizării traheei de hamster, inhibarea inducției ornitindecarboxilazei și respectiv inhibarea tumorilor induse în epidermul de șoarece) Popovici M.<sup>112</sup> et al. au obținut printr-un studiu QSAR-MTD unele informații relevante asupra topografiei sterice a situsurilor de interacțiune a receptorilor implicați în cele trei acțiuni biologice menționate ale liganzilor retinoici studiați; rezultatele corelaționare validate statistic la un nivel de încredere suficient de bun au permis propunerea unor structuri noi, cu activitățile biologice precizate mai sus mai bune.

Doi alți arotinoizi obținuți prin înlocuirea sau prin decarboxilarea grupei carboxil, Ro 15-1570 și respectiv Ro 15-0778, au prezentat un interes deosebit:



Ro 15-1570



Ro 15-0778

Derivatul decarboxilat Ro 15-0778, a demonstrat o potență de 30 de ori mai mare decât acidul 13-cis retinoic în suprimarea secreției de sebum, testosteron-stimulate. În plus, compusul nu a determinat hipervitaminoză A și nici nu a produs efecte teratogene în experimentele realizate pe animale<sup>82</sup>.

În principiu, pentru a avea o activitate biologică în modelul papilomului, orice retinoid trebuie să prezinte în structura sa, fie o grupare carboxil, fie o formă de precursor al acesteia (ester etilic). Primul compus, care deși nu mai posedă în structura sa gruparea carboxil, și-a menținut activitatea biologică, atât în testul antipapilom, cât și în testul de inhibare a diferențierii epiteliale, este denumit Ro 15-1570, iar activitatea sa este studiată, în prezent, în tratamentul psoriazisului. Datorită absenței grupării COOH, acest compus nu se mai fixează pe proteinele transportoare CRABP, dar s-a demonstrat că arotinoizii corespunzători unor acizi sulfonici și sulfonici, se fixează pe receptorii celulari

specifici, deși presupunerea că aceștia ar putea fi metaboliții compusului Ro 15-1570 nu a putut fi demonstrată<sup>119</sup>.

**Heteroarotinoizii** sunt retinoizi sintetici, derivați structurali, atât ai acidului retinoic all-trans, cât și ai arotinoizilor, ei având inclus un heteroatom într-un ciclu de cinci (fig. 1.15 - c,d) și respectiv de șase atomi (fig. 1.15 - e,f) în structura componentelor de bază.

Importanța biologică promițătoare a acestor heteroarotinoizi ca substanțe anticanceroase, utile în terapia umană, este susținută și de toxicitatea lor mult mai redusă în comparație cu a acidului retinoic all-trans sau a arotinoizilor<sup>120, 121</sup>. O posibilă explicație a acestei toxicități reduse poate fi datorată faptului că singura modificare structurală realizată, constă în includerea într-un ciclu (din structura arotinoidului sau acidului retinoic), a unui heteroatom, ceea ce, în primul caz reduce toxicitatea de 1000 de ori, iar în cazul în care modificarea are loc în structura acidului retinoic all-trans toxicitatea<sup>121</sup> se reduce de numai 3 ori.

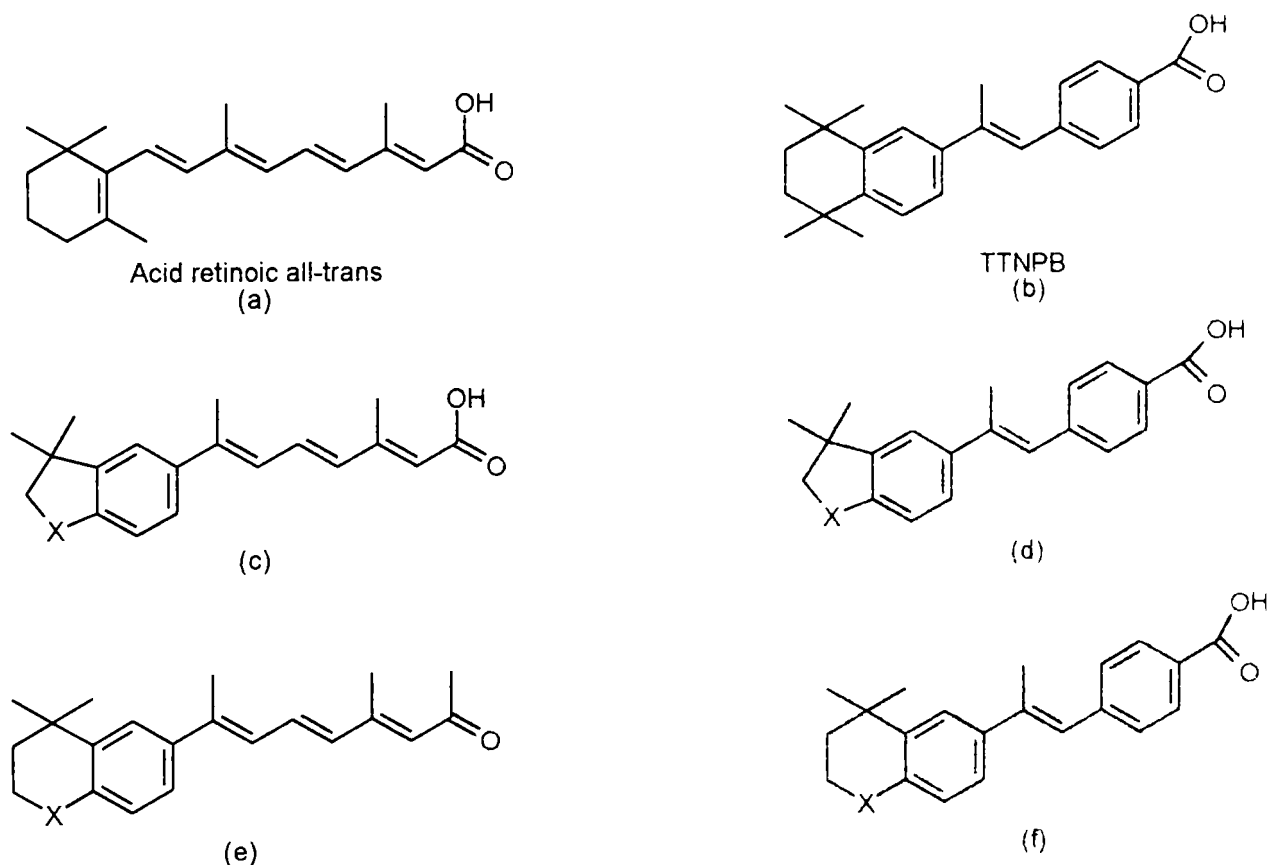


Fig. 1.15 Structurile moleculare a unor retinoizi (a), arotinoizi (b) și heteroarotinoizi (c - f)

Heteroarotinoizii rămân o clasă de compuși cu reale perspective de a deveni substanțe anticanceroase cu bune rezultate în terapeutică.

### 1.3. Receptori pentru vitamina A și retinoizi sintetici

*Receptorul* este o macromoleculă specializată în recunoașterea specifică a unei singure specii moleculare și numai a acesteia, din multitudinea de molecule cu care ar putea intra potențial în acțiune. Termenul de receptor include în definiție și faptul că stimularea receptorului de către molecule – semnal este urmată de un *răspuns biologic specific* din partea celulei (organului) la nivelul căreia este situat receptorul respectiv. Ca dimensiuni, receptorul atinge o masă de  $10^5$  daltoni (sau mai mult) și unul din diametre de 20 – 50 Å. Moleculele – semnal cu care receptorul intră în contact sunt generic numite *liganzi*. Aceste specii moleculare sunt de regulă micromolecule cu masa până la  $10^3$  daltoni și diametre de ordinul a 10 Å, iar în cazul polipeptidelor pot atinge dimensiuni comparabile cu receptorul propriu-zis. În mod fiziologic, liganzii sunt endogeni (produși de alte structuri specializate din organism) dar ei pot fi și exogeni (agenți farmacologici). În continuare se prezintă date din literatură asupra receptorilor pentru vitamina A și retinoizii de sinteză.

#### 1.3.1. Introducere

Conceptul asupra activității vitaminei A, cu excepția procesului vederii, este în continuă schimbare, în parte datorită modului complex de acțiune, dar mai ales datorită concepției că activitatea vitaminei A în sine, este nestatică.

Funcția moleculară a vitaminei A în procesul vederii, prin interacțiune cu opsinele și retinalul, a fost stabilită prin cercetările lui Wald<sup>54</sup>. Alte funcții importante ale vitaminei A, includ controlul diferențierii normale a țesuturilor epiteliale și remodelarea scheletului în procesele de creștere și reproducere.

Acidul retinoic, care nu poate fi transformat biologic la retinol sau retinal, poate asigura o existență generală bună organismelor private de retinol, cu excepția procesului vederii și a funcției de reproducere. La animale însă, acidul retinoic este degradat aparent rapid și deci, nu poate “tampona” organismul împotriva lipsei de retinol. De aceea, organismul animal trece la producerea de acid retinoic și de derivați ai acestuia, prin oxidarea depozitelor tisulare de esteri ai retinolului. Acțiunile profilactice și de inhibiție tumorală, efectele cutanate și capacitatea de a iniția diferențierea celulară, sunt în general mai potențate pentru acidul retinoic decât pentru retinol.

Nici unul dintre mecanismele de acțiune propuse până în prezent, nu explică în întregime efectele retinoizilor în controlul diferențierii, reproducerii, în controlul dezvoltării embrionare și creșterii, în refacerea leziunilor pre-neoplazice, inițierea tumorii in vivo și supresia inducției transformărilor celulare in vitro de către carcinogeni, radiații, virusuri și factori de creștere<sup>122</sup>. În principiu, există două modele importante care explică modul de acțiune a vitaminei A în funcțiile de mai sus. Primul este legat de retinol ca și coenzimă în sintezele mediate de glicoproteine ale membranelor. A doua ipoteză, bazată pe interacțiunea retinolului și acidului retinoic cu proteine specifice de legare și exprimarea finală prin efecte genomice, face obiectul prezentului subcapitol<sup>123</sup>.

### 1.3.2. Proteine de legare a retinoizilor

Vitamina A (retinol), se absoarbe printr-un mecanism de transport activ, caracteristic celulelor intestinale și facilitat de proteina citosolică specifică CRBP II. După traversarea peretelui intestinal, retinolul este esterificat cu acidul palmitic, mai ales, iar esterii săi sunt stocați în ficat. Mobilizarea și transportul retinolului (după hidroliza esterilor săi în ficat) la diverse țesuturi, sunt mediate de o proteină specifică de transport<sup>124</sup> denumită RBP (retinol binding protein). Studii extensive au fost efectuate pentru stabilirea structurii, metabolismului și rolului biologic al acestei proteine<sup>125</sup>, o  $\alpha_1$ -globulină cu greutatea moleculară de 21 kDa.

Complexul retinol – RBP se fixează probabil de receptori specifici de pe membrana celulelor țintă, de unde este preluat și transferat intracelular de către o altă proteină și anume CRBP citosolic (proteina de fixare a retinolului din citoplasmă) cu rol în metabolismul și/sau funcția retinoidului. Există posibilitatea ca proteina CRBP să medieze și transportul retinolului în nucleu. Complexul retinol – CRBP eliberează apoi retinolul, care este transformat în compuși activi diferiți în funcție de tipul țesutului țintă.

Acidul retinoic (RA), metabolitul principal de oxidare a retinolului, este un metabolit fiziologic al vitaminei A, iar pentru absorbția sa nu sunt necesare mecanisme specifice. Prin tehnici ce utilizează radiotrasori și reacții de imunoprecipitare s-a arătat că acidul retinoic este transportat în ser legat de albumine și nu necesită proteine transportoare specifice. S-a arătat de asemenea, că diverși analogi sintetici ai acidului retinoic sunt în competiție la nivelul



situsului de legare pentru acid retinoic al albuminei, ceea ce indică faptul că și aceștia sunt transportați legați de albumina serică.

Pe baza proteinei celulare a retinoizilor, au fost realizate mai multe încercări pentru determinarea mecanismului molecular al acțiunii acestora în controlul diferențierii epiteliale, al creșterii, precum și în procesul de carcinogeneză. S-a sugerat că această acțiune a retinolului și acidului retinoic, poate fi mediată de cunoscutele proteine celulare de legare CRBP și respectiv CRABP, detectate într-o mare varietate de celule și țesuturi, inclusiv în piele<sup>126</sup>.

### 1.3.3. Proteina celulară de legare a acidului retinoic

Date cu privire la existența proteinei celulare de legare a acidului retinoic (CRABP) în pielea embrionului de pui și faptul că CRABP poate fi implicată în exprimarea activității biologice a acidului retinoic și a analogilor săi sintetici, în controlul diferențierii epiteliale și carcinogenezei, au fost relativ recent publicate<sup>127</sup>. S-a determinat specificitatea CRABP pentru legarea [<sup>3</sup>H]RA în competiție cu acidul retinoic nelegat, retinol și retinal, într-un exces molar de 200 de ori. Retinolul și retinalul nu au manifestat o competiție cu acidul retinoic tritiat, în timp ce acidul retinoic nelegat a fost un agonist activ. Legarea s-a realizat cu o afinitate mare, deoarece ligandul a rămas atașat după dializă, sedimentare cu gradient de sucroză și cromatografie de gel pe coloană Sephadex. Datorită similarității dintre funcția acidului retinoic și cea a hormonilor steroizi, se poate aprecia că legarea acidului retinoic de CRABP I sau II se realizează după intrarea sa în celula țintă; un astfel de complex intră în nucleul celular și interacționează cu componentele nucleare, rezultând alterarea transcripției genelor.

În diferite laboratoare s-a realizat purificarea și caracterizarea<sup>128,129</sup> CRABP. Proteina este formată dintr-un singur lanț polipeptidic cu greutatea moleculară de 14,6 kDa, determinată prin electroforeză. S-a demonstrat că CRABP leagă acidul retinoic cu mare afinitate și în plus această proteină prezintă o specificitate crescută pentru retinoizii cu o grupare carboxil.

Studii mai recente au evidențiat existența a două subtipuri ale acestei proteine: CRABP I și CRABP II. CRABP II este forma predominantă a proteinei celulare de legare din keratinocitele umane, cu rolul de a menține concentrația intracelulară a acidului retinoic, având ca rezultat alterarea transcripției genice.

Studii realizate prin metoda PAGE<sup>126</sup>, prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă, au confirmat alte observații ulterioare și anume că:

- a. CRABP este o proteină prezentă într-o cantitate mai mare în epiderm decât în derm, în ambele țesuturi fiind decelată numai în cantități mici;
- b. CRABP este semnificativ crescută cantitativ în psoriazis;
- c. Terapia topică și cea sistemică ce utilizează retinoizi sintetici, determină o reglare pozitivă (creștere) a cantității acestei proteine specifice (CRABP).

#### 1.3.4. Mecanismul de acțiune a acidului retinoic

Pentru a-și exercita rolul său în controlul diferențierii celulare normale și al proliferării, s-a stabilit că este necesar un anumit nivel al concentrației retinoidului<sup>130</sup>. Deoarece carcinogeneza chimică implică dediferențierea, este foarte posibil ca proprietățile anticanceroase ale acidului retinoic să se datoreze, atât inhibării proliferării celulare, cât și accelerării procesului terminal de diferențiere a celulelor preneoplazice<sup>131</sup>. În acest proces, CRABP ar putea avea rol de mediator, dar și de moleculă indicatoare a dediferențierii, nivelele de CRABP fiind scăzute imediat, în etapa postnatală, dar crescute în tumori. Acțiunea biologică a acidului retinoic, având ca mediator proteina sa celulară de legare, ar putea fi similară cu cea a hormonilor, determinând inducția și/sau depresia activității genice.

Inițial, acidul retinoic formează în citoplasma celulelor țintă un complex cu CRABP I și/sau CRABP II. Acest complex migrează apoi la nivelul nucleului, unde se asociază cu elementul care răspunde la acid retinoic RARE din structura ADN nuclear. Urmărind secvența evenimentelor, într-un studiu realizat de Sani<sup>132</sup>, s-a demonstrat existența unei componente de legare a acidului retinoic în nucleeele celulelor din pielea embrionului de pui de găină și a celulelor tumorale murine transplantabile. În urmă cu 20 de ani, această localizare a reprezentat inițierea cercetării referitoare la mecanismul molecular de acțiune al acidului retinoic la nivel genetic. Profilurile de radioactivitate ale extractelor de membrane plasmatică de piele embrionară a puiului de găină, au prezentat în studiile lui Sani<sup>133</sup> un maxim distinct cu o valoare  $S_{20}$  de 2,0 egală cu cea pentru CRABP citosolic. Membrana plasmatică neextrasă, suspendată în PBS, nu a prezentat nici un maxim de legare 2S detectabil; acidul retinoic legat de

membrană a sedimentat în partea de jos a gradientului, rezultatul indicând faptul că proteina de legare este o parte integrantă a membranei. Dovezi pentru prezența CRABP în membrana plasmatică din creierul de șoarece, au indicat existența unei proteine cu greutatea moleculară de 15,8 kDa, ale cărei caracteristici de legare<sup>134</sup> mimau foarte bine pe cele ale CRABP.

Mecanismul prin care acidul retinoic traversează suprafața celulară și membrana nucleară, precum și conceptul de bază al mecanismului de control genomic, încă nu sunt complet elucidate.

O reprezentare schematică a mecanismului propus pe baza datelor din literatură pentru translocarea și acțiunea acidului retinoic în controlul diferențierii epiteliale este prezentată în fig. 1.16.

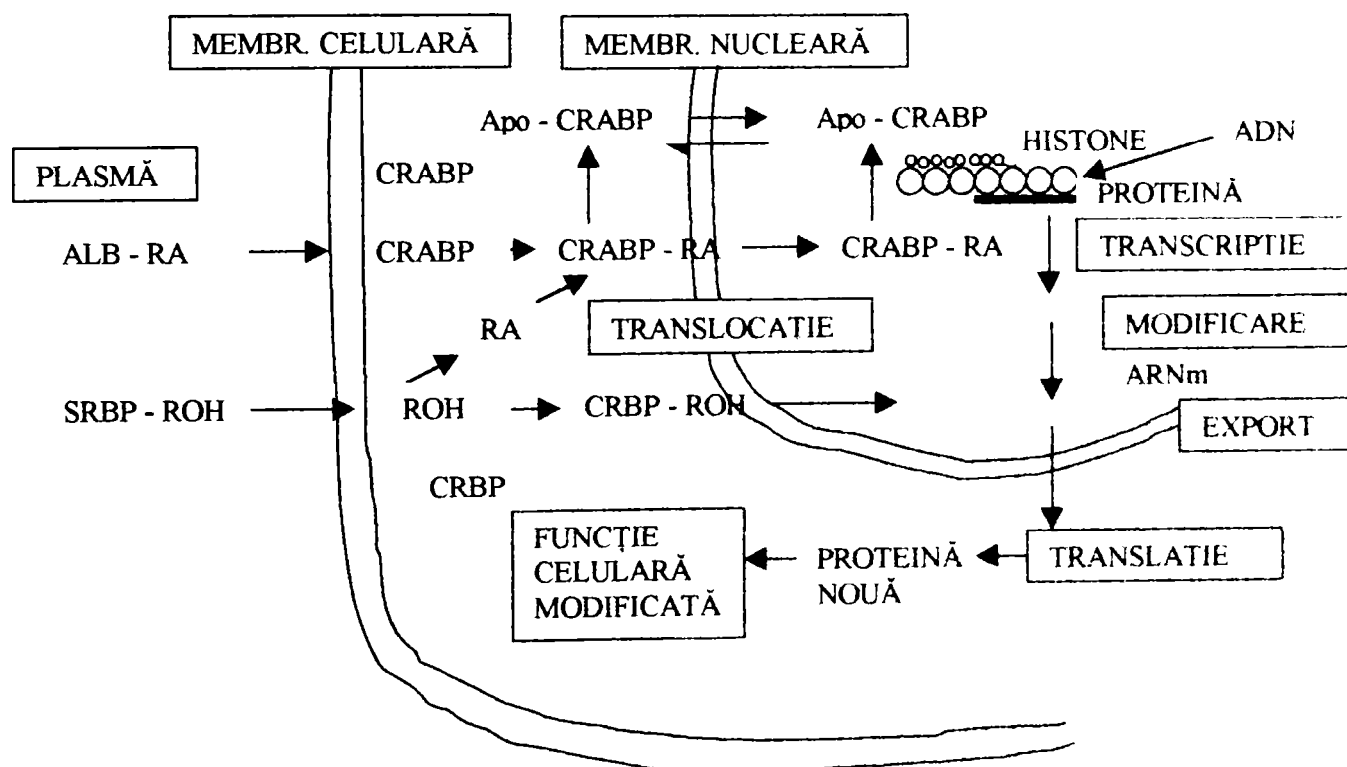


Fig. 1.16 Reprezentarea schematică a mecanismului propus pentru translocarea și acțiunea acidului retinoic: ALB-albumina serică; RA-acid retinoic; ROH-retinol; SRBP-proteina serică de legare a retinolului; CRABP-proteina celulară de legare a RA; CRBP-proteina celulară de legare a retinolului; Apo-CRABP-CRABP fără ligand.

Identificarea în plasma umană a acidului retinoic, ca metabolit major de oxidare a vitaminei A în organism, transportul său prin intermediul unei albumine serice și identificarea proteinelor celulare de legare a acidului retinoic (respectiv CRABP I și CRABP II) ca și componente ale membranei plasmatică, pot explica etapele de recunoaștere celulară și transportul selectiv pentru realizarea diferențierii epiteliale și controlul genezei tumorale. Etapa următoare

poate fi migrarea complexului CRABP – RA de la nivelul membranei celulare, cu traversarea citoplasmei, apoi a membranei nucleare până la situsurile specifice de legare situate pe ADN (RARE = element care răspunde la acid retinoic): efectul exercitat este unul direct asupra expresiei genice, afectând etapele de transcripție și translație. Identificarea Apo – CRABP în nucleeele celulelor netratate cu acid retinoic, argumentează ipoteza conform căreia complexul CRABP – RA transportă acidul retinoic la situsul specific nuclear de pe ADN; proteina de legare poate reface ciclic Apo – CRABP, aflată în echilibru cu CRABP citosolic.

### 1.3.5. Receptori nucleari pentru acidul retinoic

În 1987, Eichele și Thaller<sup>135</sup> au prezentat dovezi că acidul retinoic acționează ca un morfogen endogen.

Situsul acceptor nuclear a fost necunoscut, până în 1987, când Petkovich<sup>136</sup> et al. și Giguere<sup>137</sup> et al., au raportat aproape independent, un receptor nuclear pentru acid retinoic care aparține superfamiliei receptorilor pentru hormonii steroizi, tiroidieni și vitamina D. Proteina, cu o greutate moleculară de aproximativ 54kDa, leagă acidul retinoic cu o mare afinitate și a fost denumită RAR<sub>α</sub>. Ulterior, Brand<sup>138</sup> et al. au prezentat dovezi pentru un alt receptor nuclear al acidului retinoic (RAR<sub>β</sub>); o proteină cu o identitate aminoacidică de 97% cu receptorul cunoscut (RAR<sub>α</sub>) în domeniile de legare a ADN-ului. În fine, Benbrook<sup>139</sup> et al., au identificat și existența celui de-al treilea receptor nuclear - RAR<sub>γ</sub> (exprimat mai ales în piele).

Prin compararea secvenței primare de aminoacizi<sup>138,139</sup> s-a observat că domeniul de legare pentru ligand al receptorilor din familia RAR este foarte bine conservat (fig. 1.17) pentru toate cele trei subtipururi de receptori (peste 75% din aminoacizi sunt identici), ceea ce sugerează că ei provin dintr-un receptor ancestral comun pentru acidul retinoic.

S-a pus problema dacă toate acțiunile acidului retinoic sunt mediate numai prin intermediul acestor proteine receptoare (RAR<sub>α, β, γ</sub>), sau dacă este posibilă existența unor substraturi adiționale sensibile la acidul retinoic.

Cercetările lui Mangelsdorf<sup>140</sup> et al., au condus la identificarea primului membru al unei noi familii de receptori nucleari pentru retinoizi, numită RXR, respectiv a receptorului uman RXR<sub>α</sub>. Autorii citați au stabilit că receptorul uman RXR<sub>α</sub> (hRXR<sub>α</sub>) este o proteină ce conține un lanț de 462 aminoacizi și.

surprinzător, nu face parte din subfamilia receptorilor RAR. Secvența de aminoacizi a hRXR $_{\alpha}$  a fost comparată cu cea a altor membri ai superfamiliei receptorilor pentru hormoni steroizi și este reprezentată schematic în fig. 1.17

În fig. 1.17 regiunile cu similaritate semnificativă între hRXR $_{\alpha}$  și alți receptori nucleari sunt prezentate schematic ca % pe baza omologiei secvenței de aminoacizi.

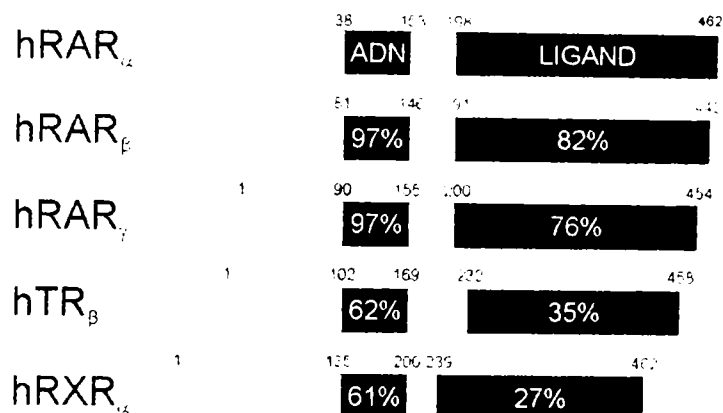


Fig. 1.17 Reprezentarea schematică a secvenței primare de aminoacizi a receptorilor hRXR $_{\alpha}$ , hRAR $_{\alpha, \beta, \gamma}$  și a receptorului hormonului uman tiroidian hTR $_{\beta}$

Regiunea ADN desemnează domeniul de legare al receptorului respectiv de ADN, iar regiunea ligand, domeniul de legare al receptorului cu ligandul. Studiul a mai evidențiat că cea mai mare omologie între hRXR $_{\alpha}$  și receptori pentru hormonii steroizi și tiroidieni o prezintă regiunea bogată în cisteină de 66 aminoacizi, începând cu reziduu 135 la hRXR $_{\alpha}$ . Deși domeniul de legare de ADN al hRXR $_{\alpha}$  este similar cu cel al altor receptori (de exemplu cu cel al RAR $_{\alpha}$ , ~ 61%) domeniul de legare al ligandului este mai puțin asemănător (omologie sub 27%) ceea ce nu a putut oferi o soluție pentru identificarea naturii ligandului acestui nou receptor. S-au studiat ca agoniști, atât acidul retinoic, cât și metaboliți sau analogi structurali. S-a mai stabilit că acidul retinoic este un ligand al receptorului hRXR $_{\alpha}$ , dar cu afinitate mai mică decât afinitatea față de hRAR $_{\alpha}$ . Prin analize Southern blot s-a determinat existența unei familii de gene RXR. S-a evidențiat astfel existența unei căi moleculare alternative de reglare genică mediată de acidul retinoic. Ulterior s-au identificat și subtipurile de receptori RXR $_{\beta}$  și RXR $_{\gamma}$  (exprimat mai ales în piele).

Yu<sup>141</sup> et al. au putut dovedi în 1991 dimerizarea receptorilor RXR și formarea de heterodimeri cu receptorii RAR, având ca efect intensificarea transcripției genice.

Cercetările ulterioare realizate de Levin<sup>142</sup> et al. au condus la identificarea ca ligand cu afinitate maximă al hRXR $_{\alpha}$ , a stereoizomerului 9-cis al acidului

retinoic. Autorii au demonstrat că acidul 9-cis-retinoic și all-trans retinoic au potență asemănătoare în activarea subfamiliei RAR, iar acidul 9-cis-retinoic a fost denumit „ligandul complementar pentru RXR $\alpha$ ”.

Zhang<sup>143</sup> et al. au evidențiat un alt aspect important: receptorii hormonilor tiroidieni (TR), precum și receptorii care leagă acidul retinoic RAR, necesită proteine nucleare auxiliare pentru o fixare eficientă de ADN. Autorii au raportat că RXR $\alpha$  este una dintre aceste proteine nucleare auxiliare. RXR $\alpha$  interacționează cu receptorul TR, cât și cu receptorii RAR și determină prin heterodimerul format creșterea funcției de transcripție genică a receptorilor RAR și creșterea propriei activități biologice.

Cercetările ulterioare efectuate de Zhang<sup>144</sup> et al. au comunicat formarea unui homodimer RXR sub acțiunea acidului 9-cis-retinoic, cu posibilitatea exprimării unui nou mecanism de acțiune al retinoizilor.

Prin spectroscopie RMN, Lee<sup>145</sup> et al. au determinat structura tridimensională a domeniului de legare de ADN pentru receptorul RXR $\gamma$  (RXR DBD). Cele două „degete de zinc” ale RXR DBD se înfășoară și formează un singur domeniu structural compus din două helixuri orientate perpendicular, asemănătoare cu regiunile corespondente ale receptorilor pentru glucocorticoizi (GR) și estrogen (ER). Spre deosebire de acești receptori, domeniul RXR DBD conține un helix adițional, situat imediat după al doilea „deget de zinc”. S-a stabilit că acest al treilea helix mediază dimerizarea proteinei receptoare și interacțiunea ei cu ADN-ul.

Utilizând o metodă cristalografică, Rastinejad<sup>146</sup> et al. au descris interacțiunile unei structuri cristaline de 1,9 Å formată de domeniul de legare de ADN a heterodimerului RXR-TR cu elementele care răspund la hormonul tiroidian situate pe ADN. S-a putut stabili că elementele care răspund la hormonul tiroidian sunt compuse din două secvențe de ADN repetitiv constituite din secvența de referință 5'-AGGTCA-3', separate prin patru perechi de baze nucleotidice. S-a sugerat că heterodimerii receptorilor nucleari recunosc spațierea între jumătățile aparținând secvenței de ADN repetitiv; deosebirea între diferiții heterodimeri constă în recunoașterea numărului de perechi de baze care separă jumătățile secvenței de referință 5'-AGGTCA-3' de pe ADN-ul direct repetitiv.

Studiul receptorilor nucleari a înregistrat un nou succes în 1995, când Bourguet<sup>147</sup> et al. au raportat izolarea și caracterizarea structurii cristaline a domeniului de legare al ligandului pentru receptorul uman RXR $\alpha$  - apo LBD.

Semnificația existenței mai multor receptori nucleari pentru acid retinoic, modul de transfer al acidului retinoic la acești receptori via CRABP și formarea

homo- și heterodimerilor ai acestor receptori nucleari, pot extinde spectrul terapeutic al retinoizilor de sinteză. Acționarea prin retinoizi naturali și de sinteză a receptorilor subfamiliilor RAR și RXR (sub formă de homodimeri sau heterodimeri) determină modificări importante: creșterea sintezei unor proteine (fibronectina) sau inhibarea sintezei altor proteine (colagenaza, keratina, colagenul de tip VII etc.).

Studiile viitoare vor aduce cu siguranță noi clarificări în acțiunea biologică indusă de receptorii nucleari ai retinoizilor, menținând poate dilema supremației ligandului asupra receptorului sau dimpotrivă superioritatea receptorului ca factor determinant al efectului biologic final.

#### **1.4. Toxicologia retinoizilor**

Primele observații asupra toxicității retinolului au fost semnalate la consumatorii de cantități mari de ficat de urs polar, explicabilă prin conținutul ridicat al acestui organ în retinol și în esterii acestuia.

Importanța vitaminei A în tratamentul hipovitaminozei A, precum și utilizarea sa și a retinoizilor de sinteză ca agenți terapeutici a impus necesitatea studiului toxicității retinoizilor.

Efectele nedorite cauzate de supradozarea<sup>148</sup> vitaminei A sau a derivaților săi sunt denumite generic „sindromul hipervitaminozei A”. Apariția primelor simptome specifice la animalele de laborator este precedată de simptomele nespecifice, ca de exemplu: scăderea apetitului, scăderea în greutate, slăbiciune sau letargie moderată, dispariția luciului blănii. Instituirea simptomelor este în general lentă, dar ea crește progresiv cu trecerea timpului și acumularea dozelor. Aproape toate simptomele sunt reversibile la întreruperea tratamentului. Apariția primelor semne de toxicitate depinde de: doza administrată, calea de administrare, vârsta, durata administrării, tipul de retinoid și efectul toxic specific. În modelele de testare a toxicității retinoizilor pe animalele de experiență, principalele organe țintă studiate sunt: pielea și anexele ei, scheletul, sângele, ficatul, testiculele și sistemul nervos central.

##### **1.4.1. Modificări la nivelul tegumentului și a structurilor anexe**

Principalele modificări observate pe pielea animalelor de experiență tratate cu retinoizi sunt: deshidratarea transepidermică, dependentă de doza

administrată, descuamarea stratului cornos, eritem, peeling și hiperplazia epidermului. În general aceste efecte sunt mai pronunțate după administrarea orală a retinoizilor. Hiperplazia epidermului atinge maximul său în medie după o săptămână de tratament continuu. După două săptămâni de tratament continuu, hiperplazia tinde să revină la normal, deși se menține o creștere ușoară a numărului straturilor celulare epidermice cât timp durează tratamentul cu retinoid. Prin studii de microscopie, hiperplazia epidermică poate fi identificată ca o acantoză, hipergranuloză, în special în celulele stratului granulos și edem intracelular și extracelular. Ulterior, acantoză devine mai puțin marcată, dar hipergranuloza persistă împreună cu un strat cornos diminuat<sup>149,150</sup>. Modificările ultrastructurii epidermice includ hiperplazia, reducerea tonofilamentelor, creșterea glicogenului și scăderea desmozomilor.

Modificările la nivelul epidermului nu sunt un fenomen toxic în sine, ele putând fi induse chiar și de doze foarte mici, neasociate cu alte efecte adverse<sup>151,152</sup>.

La nivelul dermului s-au semnalat la cobaii tratați cu doze mari de etretinat (15 mg / kg corp / zi, oral, 2 săptămâni) dilatarea și hiperemia vaselor, infiltrat celular al celulelor mononucleare și al eozinofilelor și activarea creșterii celulelor țesutului conjunctiv cu stimularea colagenului<sup>153</sup>.

Căderea părului este fenomenul cel mai des observat după tratamentul cu retinol și anumiți retinoizi<sup>154</sup>. Alopecia este deseori precedată de decolorarea părului.

Fotosensibilitate cutanată anormală se include printre cele mai obișnuite efecte adverse a acidului retinoic all-trans<sup>155,156</sup>. Etretinatul (Tigason) și izotretinoinul (Roaccutane) pot produce o fotosensibilizare asemănătoare cu acidul retinoic all-trans. Strauss<sup>157</sup> et al. au raportat o creștere a reacțiilor de tip arsură solară la 5 – 12% din pacienții unui lot tratat cu izotretinoin. Deși datele din literatura de specialitate sunt uneori contradictorii, continuă să apară raportări asupra fotosensibilizării induse de retinoizi<sup>158</sup>.

### **Reacția de fotosensibilizare**

Fotosensibilizarea poate fi definită ca fiind o consecință a acțiunii unui component (fotosensibilizator) al unui sistem, care poate determina modificări ale altui component (substratul) sub acțiunea unei radiații<sup>159</sup>. În cazul fotosensibilizării cutanate, procesul constă în mod obișnuit în absorbția unor doze nepericuloase de UVA (315-400 nm) sau din domeniul vizibil, de către specii moleculare "străine", în concentrații terapeutice, cu implicarea constituenților



celulari și tisulari, în disiparea energiei absorbite și generarea unor reacții cutanate anormale.

Mecanismele moleculare ale fotosensibilizării sunt variate; ele depind de: structura fotosensibilizatorului, de biomolecula cu care acesta se asociază și dacă oxigenul este sau nu necesar. Mecanismele variază de asemenea, la nivel celular, respectiv tisular. La microorganisme și culturi celulare mai complexe, fotosensibilizarea poate determina distrugerea membranei celulare, inhibarea sintezei macromoleculor, mutageneza și moartea celulară, mediate de modificări ale celulelor țintă care pot fi: proteine, lipide sau acizi nucleici. La nivelul pielii, reacțiile inflamatorii imediate sau de tip întârziat, cu grade de severitate variate, rezultă direct din reacții la nivel celular sau tisular și sunt incluse într-o categorie largă, denumită " reacții fototoxice"; dacă este implicat sistemul imun se utilizează termenul de "fotoalergie"<sup>155</sup>.

În general, reacțiile fototoxice și fotoalergice sunt dăunătoare pielii. Cu toate acestea, principiul fototoxicității este utilizat în condiții controlate cu beneficii, în cadrul metodei de fotochimioterapie denumită PUVA (psoralen + UVA) cu aplicații în tratamentul psoriazisului și în vitiligo.

#### **Mecanismele de fotosensibilizare.**

Fotochimia și mecanismele moleculare ale fotosensibilizării sunt complexe<sup>159,161</sup>. O explicație simplificată implică absorbția de către molecula sensibilizatorului a unei radiații potrivite, având ca rezultat o rearanjare a electronilor, iar din punct de vedere energetic molecula trece din starea fundamentală în starea excitată singlet. Revenirea la starea fundamentală poate avea loc prin emiterie de energie radiantă sau prin ciocniri cu alte molecule, în cazul că acestea se produc mai rapid decât procesul chimic respectiv. Astfel, tranziția electronică  $S_1 \rightarrow S_0$  (starea singlet<sub>1</sub> → starea fundamentală) numită și fluorescență are loc cu o viteză de  $10^{-9}$  -  $10^{-6}$  s în cazul celor mai multe substanțe organice. Chiar dacă ar putea avea loc, durata de existență foarte scurtă a stării singlet, face improbabilă interacțiunea moleculei respective cu substratul și deci, o posibilă fotosensibilizare. Acest tip de interacțiuni sunt mult mai probabile ca urmare, a tranziției electronice  $T_1 \rightarrow S_0$  (starea triplet<sub>1</sub> → starea fundamentală), având loc cu inversare de spin (proces interzis) care decurge mai lent, în  $10^2$  -  $10^{-1}$  s, durata de existență a unei stări triplet fiind în consecință mai mare decât a unei stări singlet.

*Reacțiile fotosensibilizante, respectiv de fotosensibilizare decurg ca regulă generală prin starea excitată triplet. Formarea stării triplet pare a fi mai bine corelată cu potențialul de fotosensibilizare iar în cazul în care sunt*

*implicate sisteme biologice, alți doi factori devin în egală măsură importanți: liposolubilitatea fotosensibilizatorului și gradul de interacțiune cu oxigenul.*

Pentru realizarea interacțiunilor între starea excitată triplet a fotosensibilizatorului și biomolecula substrat există mai multe căi posibile.

În primul rând, prin reacții de tip I, prin care transferul de electron sau proton generează formarea de radicali liberi activi atât ai substratului cât și ai fotosensibilizatorului. Reacțiile consecutive sunt variate, dar în mod obișnuit, oxigenul este implicat în producerea substratului oxidat complet și regenerarea fotosensibilizatorului. Substratul poate fi oxidat direct de către peroxidul de hidrogen, radicali hidroxil, produși de interacțiune între radicalii liberi ai fotosensibilizatorului și oxigen, sau prin alte căi.

În al doilea rând, reacțiile de transfer energetic, implică formarea unei stări excitate singlet a oxigenului, cu reactivitate ridicată, care poate oxida direct, un număr important de molecule biologice cu rol de substrat.

Majoritatea reacțiilor de fotosensibilizare par să fie oxigen-dependente, în aceste cazuri, termenul utilizat în prezent fiind de "acțiune fotodinamică"

Există, în plus și un număr important de reacții oxigen-independente, dintre care cea mai cunoscută este legarea psoralenilor de ADN sub acțiunea UVA.

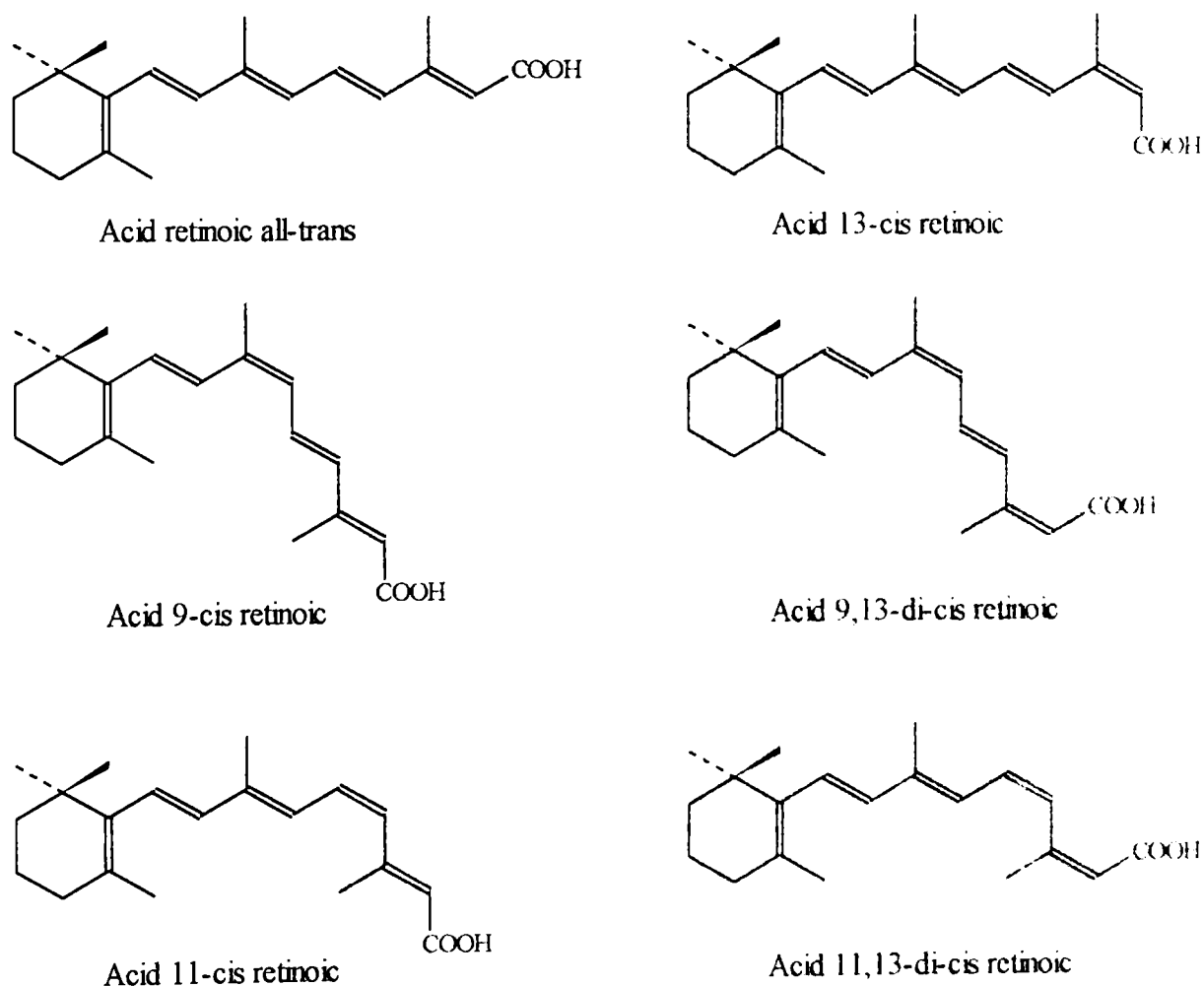
În cazul oricărui fotosensibilizator, efectul biologic ar putea fi rezultatul unuia sau mai multor moduri de acțiune preferențiale, decât a unei reacții unice, bine definite. De aceea, modelele utilizate pentru studiul fotosensibilizării la nivel molecular și celular, trebuie să evedențieze o înțelegere cât mai clară a celei mai importante reacții din cadrul celor posibile<sup>162</sup>.

Fototoxicitatea este cel mai obișnuit mecanism implicat în fotosensibilizarea indusă de medicamente. Cazurile în care medicamentele au produs atât reacții fotoalergice cât și fotosensibilizare cutanată anormală sunt rare.

Caracteristicile fototoxicității, deși descrise frecvent ca o formă de "arsură solară puternică" sunt mult mai complexe<sup>163</sup>. Reacțiile semnalate cuprind: înțepături imediate, senzație de arsură cu eritem sau eritem cu manifestare întârziată, fragilitatea și descuamarea pielii. Deși în general fotosensibilizarea indusă de medicamente dispare în 1-2 săptămâni după întreruperea terapiei, au fost raportate ocazional, reacții de fotosensibilizare care au persistat luni de zile. Mecanismele implicate în persistența prelungită a fotosensibilizării nu sunt cunoscute dar ar putea să includă factori farmacocinetici de tip idiosincrazic, ca de exemplu retenția unor metaboliți fotoactivi.

## Fotosensibilizarea indusă de retinoizi.

Prima regulă a fotochimiei afirmă că orice reacție fotochimică are loc prin activarea moleculelor consecutiv absorbției de cuante de energie radiantă, aplicându-se în egală măsură și reacției de fotosensibilizare. Această cerință este valabilă și în cazul retinoizilor, fapt confirmat de spectrele de absorbție în ultraviolet, ale acestora. O caracteristică principală a retinoizilor este denaturarea lor prin expunere la lumina solară. În consecință se poate afirma că toți retinoizii sunt fotochimic activi. Este cunoscută fotochimia 11-cis retinalului, centrată pe izomerizarea sa, în forma all-trans a moleculei. O fotoizomerizare similară este posibilă atât pentru vitamina A (retinol) cât și în particular pentru acidul retinoic. Studiile referitoare la fotochimia acidului retinoic all-trans cât și a izoretinoinului (izomerul 13-cis) sau asupra etretinatului, sunt încă relativ puține. Prin iradierea acidului retinoic all-trans cu o lampă de fluorescență s-au obținut prin reacții de fotoizomerizare mai mulți izomeri geometrici ai retinoinului separați prin metoda HPLC cu fază inversă<sup>164</sup>.



*Fig. 1.18 Structura moleculară a acidului retinoic all-trans și a unor stereozomeri geometrici mai importanți*

Structura moleculară a celor mai importanți izomeri obținuți prin reacția de fotoizomerizare a acidului retinoic în condițiile experimentului menționat<sup>164</sup> este prezentată în fig. 1.18.

Studii simple, au arătat că etretinatul, sub formă de pulbere suferă o denaturare în proporție de 27%, rezultând un amestec de izomeri cis/trans și dimeri, iar în soluție etanolică se ajunge la un echilibru între izomeri, în care izomerul all-trans reprezintă numai 10 %. În cazul izotretinoinului, are loc un proces similar de fotoizomerizare. Atât pentru acidul retinoic all-trans cât și pentru retinaldehida, s-a demonstrat obținerea unei cantități mici dar semnificative de compuși în starea energetică triplet<sup>165</sup>. În consecință, este posibilă producerea unei reacții de fotosensibilizare de către cei doi compuși menționați.

### *Studii clinice*

Studiile clinice efectuate pentru confirmarea diagnosticului de fotosensibilizare indusă de retinoizi administrați oral, au fost descrise la pacienți cu psoriazis și ichtiosis tratați cu etretinat, respectiv pacienți cu acnee tratați cu o doză de 10-30 mg/zi izotretinoin, timp de minimum patru luni<sup>166</sup>. În condițiile specifice celor două terapii sistemice, s-au examinat subiecții tratați pentru identificarea unor simptome de fotosensibilizare induse de retinoizi. Într-un singur caz, al unui pacient cu ichtiosis tratat cu etretinat a fost descrisă o tendință la eritem fără pigmentare, agravată de tratamentul cu etretinat. Studiul a avut ca obiectiv și determinarea dozei minime de producere a unui eritem (MED) la pacienți tratați cu etretinat respectiv izotretinoin<sup>166</sup>. Studiul citat a confirmat date anterioare care afirmă că retinoizii administrați sistemic, sunt rar fotosensibilizanți, totuși ei sau metaboliții lor (în cazul etretinatului) pot avea potențial fototoxic. În cazul izotretinoinului apariția unor simptome de fotosensibilizare este dependentă și de doza de retinoid utilizată.

### *Studii in vitro*

Numeroase teste in vitro sunt disponibile pentru determinarea potențialului fototoxic al substanțelor chimice și studiul modului lor de acțiune.

Trei modele mai importante au fost utilizate pentru studiul unor aspecte ale acțiunii retinoizilor (acidul retinoic all-trans, etretinatul și metaboliții săi, etretinul și izoetretinul, izotretinoinul și metaboliții săi 4-oxo-izotretinoin).

Modelul fotohemolizei a fost aplicat de Hetherington și Johnson<sup>167</sup> pentru acidul retinoic all-trans, izotretinoin și metabolitul său 4-oxo-izotretinoin. Metoda constă în fotohemoliza hematiilor umane suspendate într-o soluție diluată și eliberarea hemoglobinei la o expunere standard la UVA (12,2 J/cm<sup>2</sup>) sub acțiunea efectului fotosensibilizator al retinoizilor menționați. Studiul a determinat și valoarea unui indice de fototoxicitate bazat pe concentrația de medicament necesar pentru producerea unei hemolize de 50% în condițiile experimentului. Valoarea indicelui de fototoxicitate descrește în ordinea: etretinat, acid retinoic all-trans, izotretinoin, 4-oxo-izotretinoin. Etretinatul nu a produs hemoliză.

Un alt model, utilizând culturi de limfocite umane<sup>167</sup> a condus la rezultate similare. În acest model, fototoxicitatea este apreciată prin inhibarea captării [<sup>3</sup>H] timidinei de limfocite, după stimulare cu PHA. Etretinatul nu a manifestat efect fototoxic nici în acest model. În cazul etretinatului și al acidului retinoic all-trans, concentrația de retinoid necesară pentru a produce fototoxicitate a fost de un ordin de mărime mai mică decât pentru fotohemoliză. Rezultatul poate fi interpretat prin posibilitatea implicării în efectul de fotosensibilizare produs de cei doi retinoizi, a unei ținte intracelulare (nucleul).

Testul microbiologic descris de Daniels<sup>168</sup> utilizând *Candida albicans* nu a permis demonstrarea potențialului fototoxic pentru nici unul dintre retinoizii menționați la testul fotohemolizei.

*Studiile realizate in vitro au evidențiat clar caracterul de substanță fotosensibilizantă a acidului retinoic all-trans.* Deși etretinatul nu este el însuși fotosensibilizant, retinoidul poate produce fotosensibilizare cutanată, datorată principalului său metabolit, iar izotretinoinul poate determina fotosensibilizare atât direct, dar și indirect datorită metabolitului său 4-oxo-izotretinoin.

#### **1.4.2. Modificări ale sistemului osos**

Câteva dintre cele mai importante efecte în testarea toleranței retinoizilor in vivo sunt modificările osoase la rozătoarele de laborator. De regulă șobolanii sunt mai sensibili decât șoarecii. Cu excepția unei hiperostoze corelată cu vitamina A, nu au apărut în literatură decât comunicări sporadice privind modificările osoase la speciile nerozătoare.

Modificările osoase observate în primul rând la rozătoarele de laborator după tratamentul cu vitamina A sau retinoizi sunt de tipul remodelării activate.

Ele sunt precedate clinic de o activitate motorie redusă, sensibilitate crescută la manipulare, o postură curbată și o cifoză mai mult sau mai puțin pronunțată. Dacă retinoizi ca acidul retinoic sau etretinatul sunt administrați șobolanilor în doze mari (50 și respectiv 100 mg / kg corp / zi), fracturile apar după aproximativ o săptămână<sup>154</sup>.

### **1.4.3. Efecte hematologice**

Investigațiile hematologice realizate prin diverse teste au demonstrat efecte diferite ale vitaminei A și ale retinoizilor asupra parametrilor celulei sangvine. S-a demonstrat că toxicitatea vitaminei A este asociată cu diminuarea numărului de eritrocite și valori reduse ale hematocritului la o varietate de specii. Un număr scăzut de eritrocite a fost observat la rozătoare după administrarea repetată de acid retinoic<sup>169</sup>.

### **1.4.4. Modificări hepatice**

Ficatul este principalul organ de stocare<sup>170</sup> al vitaminei A în organism (peste 90%). Consumul cronic al unor doze mari de vitamină A (între 3 și 180 mg RE / zi la o varietate de specii; raportate în studiul lui Nieman și Klein-Obbig<sup>171</sup>) a fost asociat cu hepatomegalia și degenerarea grăsoasă.

În studiile în care s-a administrat acid retinoic timp de 13 săptămâni (doze între 5 și 50 mg / kg corp / zi) s-au observat nivele reduse ale proteinelor serice, dar nu s-au putut evidenția histologic<sup>172</sup> modificări hepatice.

### **1.4.5. Modificări testiculare**

S-au raportat efecte adverse ale retinoizilor asupra țesuturilor testiculare, fie prin stoparea spermatogenezei, fie prin atrofiere tubulară. Aceste modificări s-au dovedit a fi dependente de doza administrată și reversibile la întreruperea tratamentului<sup>173</sup>.

#### 1.4.6. Modificări la nivelul sistemului nervos central

Unul din argumentele cercetării efectelor adverse pe SNC, în studii preclinice experimentale de siguranță cu retinoizi este cunoașterea faptului că supradozarea vitaminei A este asociată cu tulburări neurologice la om ca: oboseală, letargie, iritabilitate crescută, cefalee, amețeli<sup>148</sup>. Deși majoritatea acestor simptome sunt dificil de diagnosticat la animalele de laborator, totuși simptome ca oboseala, letargie și iritabilitate crescută au fost observate la șobolani și câini tratați cu doze mari de retinoizi.

#### 1.4.7. Teratogeneza și toxicitatea reproductivă a retinoizilor

Vitamina A și majoritatea retinoizilor testați până în prezent sunt embriotoxici și teratogeni pentru animalele de laborator dacă se administrează în doze mari în etapele susceptibile ale gestației<sup>174</sup>.

### 1.5. Bibliografie

1. Woolbach S.B., Howe P.R., *J. Exp. Med.*, **43**, 753 – 777, 1925.
2. Hibi S., Kikuchi K., Zoshimura H., Nagai M., Tai K., Hida T., *J. Med. Chem.*, **41**, 3245 – 3252, 1998.
3. Benbrook D.M., Subramamian S., Gale J.B., Liu S., Brown C.W., Boehm M.F., Berlin K.D., *J. Med. Chem.*, **41**, 3753 – 3757, 1998.
4. Drummond J.C., *Biochem J.*, **14**, 660, 1920.
5. Karrer P., Morf P., Schoepp K., *Helv. Chim. Acta*, **21**, 211 – 222, 1937.
6. Holmes H.N., Corbet R.E., *J. Am. Chem. Soc.*, **59**, 20-42, 1937.
7. Baxter J.G., Robeson C.D., *J. Am. Chem. Soc.*, **64**, 2407 – 2411, 1942.
8. Schwieter U et al, *Helv. Chim Acta*, **45**, 517, 1962.
9. Sporn M.B., Dunlop M.M., Menton D.L., Smith J.M., *Fed. Proc.*, **35**, 1332, 1976
10. IUPAC – IUB, Joint Commission in Biochemical Nomenclature, *Eur. J. Biochem.*, **129**, 1, 1982.
11. Sporn M.B., Roberts A.B., *Ciba Found. Symp.*, **113**, 1, 1985.
12. IUPAC – IUB, Commission on Biochemical Nomenclature (CBN), *Eur. J. Biochem.*, **25**, 397 – 407, 1972; **57**, 317 – 318, 1975; *Pure Appl. Chem.*, **41**, 405 – 431, 1975
13. Oeriu S., *Biochimie medicală*, Ed. Didactică și pedagogică, București, 1983.
14. Isler O., Hubert W., Ronco A., Kofler M., *Helv. Chim. Acta*, **30**, 1911 – 1927, 1947.
15. Pawson B.A. et al., *J. Med. Chem.*, **20**, 918 – 925, 1977.
16. Pawson B.A. et al., *J. Med. Chem.*, **22**, 1059 – 1067, 1979.
17. Longnecker D.S., Kuhlmann E.T., Curphey T.J., *Cancer Res.*, **43**, 3219 – 3225, 1983.
18. Longnecker D.S., Kuhlmann E.T., Curphey T.J., *Cancer Res.*, **43**, 3226 – 3230, 1983.
19. Rosenberger M., Lovey A., Grippo J.F., *Nature (London)*, **355**, 359 – 361, 1992.
20. Kienzle F., *Pure Appl. Chem.*, **47**, 183, 1976.

21. Bedeleanu D., Manta I., *Biochimie medicală și farmaceutică*, Ed. Dacia, Cluj Napoca, 1985.
22. Enescu A.L., Oiță N.N., *Bazele vitaminoterapiei, vol. I*, Ed. Junimea, Iași, 1990.
23. Oberhansli W.E., Wagner H.P., Isler O., *Acta Crystallogr. Sect. B. Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.*, **30**, 161, 1974.
24. Hamanaka T., Mitsui T., Ashida T., Kakudo M., *Acta Crystallogr. Sect. B. Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.*, **28**, 241, 1972.
25. Stam C.H., *Acta Crystallogr. Sect. B. Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.*, **28**, 2936, 1972.
26. Iwahashi H., Ikeda A., Negoro Y., Kido R., *Biochem. J.*, **236**, 509, 1986.
27. Correa P., Hardy G., Ridley D., *J. Org. Chem.*, **53**, 1695, 1988.
28. Oyler A.R., Motto M.G., Naldi R.E., Facchine K.L., Hamburg P.F., Burinsky D.J., Dunphy R., Cotter M.L., *Tetrahedron, vol. 45, No. 24*, 7679 – 7694, 1989.
29. Karrer P., Jucker E., *Helv. Chim. Acta.*, **29**, 229, 1946.
30. Ball S., Goodwin W., Morton R.A., *Biochem. J.*, **42**, 516, 1948.
31. Frank B., Dust M., Stange A., Hoppe P.P., *Naturwissenschaften*, **69**, 401, 1982.
32. Jungalwala F.B., Cama H.R., *Biochem. J.*, **95**, 19, 1965.
33. Wald G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **41**, 438, 1955; Brown P.K., Wald G., *J. Biol. Chem.*, **222**, 865, 1956.
34. Carr F.H., Price E.H., *Biochem. J.*, **20**, 497, 1926.
35. Stastny C.S.P., *Indian Drugs*, **23**, 242, 1986.
36. Bayfield R.F., Cole E.R., *Methods Enzymol.*, **67 F**, 189, 1980.
37. Grys S., *Methods Enzymol.*, **67 F**, 195, 1980.
38. Oliver L.K., *Methods Enzymol.*, **67 F**, 199, 1980.
39. Chiosa L., Neumann M., *Vitamine și antivitamine*, Ed. Medicală, București, 1956.
40. Glover J., *Methods Enzymol.*, **67 F**, 282, 1980.
41. Wyss R., *J. Chromatogr. B.*, **671**, 381 – 425, 1995.
42. Van Vliet T. et al., *J. Chromatogr.*, **553**, 179, 1991.
43. Takeda N., Zamamoto A., *J. Chromatogr. B.*, **657**, 53, 1994.
44. Periquet B. et al., *Clin. Chim. Acta*, **203**, 5 – 7, 1991.
45. Guiso G., Rambaldi A., Dimitrova B., Biondi A., Caccia S., *J. Chromatogr. B.*, **656**, 234, 1994.
46. Bun H. et al., *Methods Enzymol.*, **189**, 167, 1990.
47. Al-Mallah N.R., Bun H., Durand A., *Anal. Lett.*, **21**, 1603, 1988.
48. Frolik C.A., in: *The Retinoids 2*, 177-208, Sporn M.B., Roberts A.B., Goodman D.S (eds), Academic Press Inc., 1984.
49. Stroescu V., *Bazele farmacologice ale practicii medicale, ediția a VI-a*, 699-710, Ed Medicală, București, 1998.
50. Goodman D.S., Blamer W.S., in: *The Retinoids 2*, 2-39, Sporn M.B., Roberts A.B., Goodman D.S. (eds.), Academic Press Inc., 1984.
51. Chytil F., Ong D.E., in: *The Retinoids 2*, 90-123, Sporn M.B., Roberts A.B., Goodman D.S. (eds), Academic Press Inc., 1984.
52. Bollag W., *Experientia*, **27**, 90 – 92, 1971.
53. Silverman A.C., Ellis C.N., Vorhees J.J., *J. Am. Acad. Derm.*, **16**: 1027-1039, 1987.
54. Wald G., *Science*, **162**, 230-239, 1968.
55. Chiang T.H., *J. Chromat.*, **182**, 335-340, 1980.
56. De Leenheer A.P., Lambert W.E., Claeys I., *J. Lipid. Res.*, **23**, 1362-1367, 1982.
57. Vane F.M., Stoltenberg J.K., Bugge C.J.L., *J. Chromat.*, **227**, 471-484, 1982.
58. Faed E.M., *Drug Metab. Rev.*, **15**, 1213-1249, 1984.
59. Chytil F., *J. Am. Acad. Derm.*, **15**, 741-747, 1986.
60. Smith J.E., Milch P.O., Muto Y., Goodman D.S., *Biochem. J.*, **132**, 821-827, 1983.
61. Siegenthaler G., Saurat J.G., in: *Retinoids: New Trends in Research and Therapy*, 168 – 174, Saurat J.H./ed.) Karger, Basel, 1984.
62. Cullum M.E., Zile M.H., *J. Biol. Chem.*, **260**, 10590-10596, 1985.



63. Zile M.H., Inhorn R.C., De Luca H., *J. Biol. Chem.*, **257**, 3537-3542, 1982.
64. Swanson B.N., Frolik C.A., Zaharewity D.W., Roller P.R., Sporn M.B., *Biochem Pharmac.*, **30**, 107-113, 1981.
65. Patel I.H., Khoo K.C., Colburn W.A., *Drug Metab. Dispos.*, **10**, 387-390, 1982.
66. Verweij H., Van Voorst Vader P.C., Houthoff H.J., Gips C.H., in: *Retinoids: New Trends in Research and Therapy*, 301 – 304, Saurat J.H. (ed.), Karger, Basel, 1985.
67. Kalin J.R., Starling M.E., Hill D.L., *Drug Metab. Dispos.*, **9**, 196-200, 1981.
68. Roberts A.B., Frolik C.A., *Fedn. Proc.*, **38**, 2524-2527, 1979.
69. Lucek R.W., Colburn W.A., *Clinical Pharmacokinetics*, **10**, 38062, 1985.
70. Kligman A.M., Fulton J.E., Plewig G., *Arch. Dermatol.*, **99**, 469-476, 1969.
71. Johnson A.T., Klein E.S., Gillet S.J., Song T.K., *J. Med. Chem.*, **38**, 4764-4767, 1995.
72. Lutzozo-Holm C., De Angelis P., Clausen O.P.F., *Epith. Cell. Biol.*, **4**, 2-7, 1995.
73. Proksch E., Feingfold K.R., Mao-Qiang M., Elias P.M., *J. Clin. Invest.*, **87**, 1668-1673, 1991.
74. Thacher S.M., Standeven A.M., Athamikar J., Kopper S., Castilleja O., Escobar M., Beard R.L., Chandraratna R.A.S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**, Nr. 2, 528-534, 1997
75. Kligman L.H., Chen H.D., Kligman A.M., *Conn. Tiss. Res.*, **12**, 139-150, 1984.
76. Schwartz E., Cruickshank F.A., Mezick J.A., Kligman L.H., *J. Invest. Dermatol.*, **96**, 975-978, 1991.
77. Kauh Y.C., Zachian T.F., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **455**, 491 – 499, 1999.
78. Dragomirescu A., Deheleanu C., *Dermatologie și Cosmetologie*, Ed. Brumar, Timișoara, 2000.
79. Peck G.L., Olsen T.G., Yoder F.W., *New Engl. J. Med.*, **300**, 329-333, 1979
80. Goldsmith L.A., Weinrich A.E., Shupack J., *J. Am. Acad. Dermatol.*, **6**, 710, 1982.
81. Elias P.M., Williams M.L., *Arch. Dermatol.*, **117**, 160 – 180, 1981.
82. Allen J.G., Bloxham D.P., *Pharmac. Ther.*, **40**, Nr 1, 1-27, 1989.
83. Brazzell R.K., Vane F.M., Ehmann C.W., Colburn W.A., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **24**, 695-702, 1983.
84. Goodman G.E., Einspahr J.G., Alberts D.S., Davis T.P., Leigh S.A., *Cancer Res.*, **42**, 2087-2091, 1982.
85. Wang C.C., Campbell S., Furner R.L., Hill D.L., *Drug Metabol. Dispos.*, **8**, 8-11, 1980.
86. Puglisi C.V., Da Silva J.A.F., *J. Chromat.*, **152**, 421-430, 1978.
87. Khoo K.C., Reik D., Colburn W.A., *J. Clin. Pharmacol.*, **22**, 395-402, 1982.
88. Windhorst D.B., Nigra T., *J. Am. Acad. Derm.*, **6**, 675-682, 1982.
89. Goldstein J.A., Socha-Szott A., Thomsen R.J., Pochi P.E., Shalita A.R., Strauss J.S., *J. Am. Acad. Derm.*, **6**, 760-765, 1982.
90. Gomez E.C., Moskowitz R.J., *J. Invest. Derm.*, **74**, 392-397, 1980.
91. Kligman L.H., Mills O.H., *Arch. Derm.*, **106**, 843-850, 1972.
92. Mezick J.A., Bhatia M.C., Capetola R.J., *J. Invest. Derm.*, **83**, 110-113, 1984.
93. Kligman L.H., Kligman A.M., *J. Invest. Derm.*, **74**, 354-358, 1979.
94. Sporn M.B., Dunlop N.M., Newton D.L., Henderson W.R., *Nature*, **263**, 110-113, 1976
95. Eichner R., *J. Am. Acad. Derm.*, **15**, 789 – 797, 1986.
96. Wu R., Wu M.M., *J. Cell. Physiol.*, **127**, 73 – 82, 1986.
97. Kenney M.C., Shih L.M., Lambermeir U., Sauterfield D., *Biochim. Biophys. Acta*, **889**, 156 – 162, 1986.
98. Jetten A.M., Shirley J.E., *J. Cell. Physiol.*, **123**, 386 – 394, 1985.
99. Daly T.J., Weston W.L., *J. Am. Acad. Derm.*, **15**, 900 – 902, 1986.
100. Brickerhoff C.E., Nagase H., Nagel J.E., Harris E.D., *J. Am. Acad. Derm.*, **6**, 591 602, 1982.
101. Ball I.J., Hawkes J.E., Ney U.M., Westmacott D., Williams D., *Br. J. Pharmacol.*, **89**, 815p. 1986a.
102. Ball I.J., Hawkes J.E., Ney U.M., Westmacott D., Williams D., *Br. J. Pharmacol.*, **89**, 814p. 1986b.

103. Ellis C.N.S., Grekin R.C., Lobuglio A.F., Varhees T.T., *Archs. Derm.*, **121**, 877-880, 1985.
104. Paravicini U., Stoeckel K., Macnamara P.J., Hanni R., Busslinger A., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **359**, 54-67, 1981.
105. Colburn W.A., Gibson D.M., Rodriguez L.C., Bugge C.J.L., Blumenthal H.P., *J. Clin. Pharmac.*, **25**, 583-589, 1985.
106. Ray S., Begg E., Wade D., *Clin. Experim. Pharmac Physiol.*, **8**, 674p, 1981a.
107. Hanni R., *Dermatologica*, **157** (Suppl. D), 5-10, 1978.
108. Rollman O., Vahlquist A., *Br. J. Dermatol.*, **109**, 439-447, 1983.
109. Vahlquist A., Rollman O., Pihl-Lundin I., *Acta Derm.-Vener.*, **66**, 431-434, 1986.
110. Hanni R. et al., *Helv. Clin. Acta.*, **60**, 2309 – 2325, 1977.
111. Loelinger P., Bollag W., Mayer H., *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.*, **15**, 9-15, 1980.
112. Popovici M., Ciubotariu D., Dragoş D., Mureşan S., Grozav A., Simon Z., *Quant. Struct.-Act. Relat.*, în curs de publicare.
113. Bollag W., *Cancer Chemother. Pharmac.*, **7**, 27-29, 1981.
114. Bollag W., in: *Retinoids: New Trends in Research and Therapy*, 274 - 288, Saurat J. H (ed.), Karger, Basel, 1984.
115. Schiff L.J., Okamura W.H., Dawson M.I., Hobbs P.D., in Dawson M.I., Okamura W.H. (eds), *Chemistry and Biology of Synthetic Retinoids*, CRC Press, Boca Raton Fla. 307 - 364, 1990.
116. Dawson, M. J., Hobbs, P. D., Derdzinski, K., Chan, R. L., Gruber, J., Chao, W., Smith, S., Thies, R. W., Schiff, L. J., *J. Med. Chem.*, **1984**, *27*, 1516 – 1531.
117. Dawson, M.J., Hobbs, P.D., Chan, R.L., Chao, W., Fung, V.A., *J. Med. Chem.*, **1981**, *24*, 583 – 592.
118. Dawson, M.I., Chao, W., Hobbs, P.D., Delair, T., in Dawson, M.I., Okamura, W.H. (Eds.) *Chemistry and Biology of Synthetic Retinoids*, CRC Press, Boca Raton, Fla. 1990, 385 – 466.
119. Klaus M., Bollag W., Huber P., Kung H., *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.*, **18**, 425-429, 1983.
120. Benbrook D.M. et al., *J. Med. Chem.*, **40**, 3567-3583, 1997.
121. Benbrook D.M., Subramanian S., Gale J.B., Liu S., Brown C.W., Boehm M.F., Berlin K.D., *J. Med. Chem.*, **41**, 3753-3757, 1998.
122. Sporn M.B., Newton D.L., in: Le Beck & Lipkin M. (eds.), *Inhibition and tumor induction and development*, Plenum Publishing, New York, 71p, 1981a.
123. Popovici M., *Zilele Academice Timişene*, Ed. a VII-a, 27 – 28 Mai 1999, Timişoara. publ. vol. rez. p. 62.
124. Goodman D.S., *Vitam. Horm.*, **32**, 167p, 1974a.
125. Goodman D.S., in: *The Retinoids 2*, p. 4, Sporn M.B., Roberts A.B., Goodman D.S. (eds.), Academic Press, Orlando, 1984.
126. Siegenthaler G., Saurat J.G., Hotz A., Levy P., Camenzind H., Merot Y., *J. Invest. Derm.*, **86**, 42-45, 1986.
127. Sani B.P., Hill D.L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 1276p, 1974a.
128. Sani B.P., Bamerjee C.K., *Biochem. J.*, **173**, 643p, 1978a.
129. Saari J., Futterman S., Bredberg L., *J. Biol. Chem.*, **253**, 6432p, 1978a.
130. Wolbach S.B., in: Serell W.H. & Harris R.W. (eds.), *The Vitamins*, Academic Press, New York, 106p, 1954a.
131. Jetten A.M. et al., *Cancer Res.*, **47**, 3523, 1987.
132. Sani B.P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **75**, 7p, 1977a.
133. Sani B.P., Bamerjee C.K., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **359**, 420p, 1981a.
134. Godowski P.J. et al., *Nature*, **325**, 365-368, 1987.
135. Eichelle G., Thaller G., *J. Cell. Biol.*, **105**, 1917p, 1987a.
136. Petkovich M. et al., *Nature (London)*, **330**, 444p, 1987a.
137. Giguere V. Et al., *Nature (London)*, **330**, 624, 1987.
138. Brand M. et al., *Nature (London)*, **332**, 850, 1988.

139. Benbrook D., Lernhardt E., Phahl M., *Nature*, **333**, 669-672, 1988.
140. Mangelsdorf D.J., Ong S.E., Dyck J.A., Evans R.N., *Nature*, **345**, 224-229, 1990
141. Yu V.C. et al., *Cell*, **67**, 1251 – 1266, 1991.
142. Levin A.A. et al., *Nature*, **355**, 359 – 361, 1992.
143. Zhang X.-K., et al., *Nature*, **358**, 587 – 590, 1992.
144. Zhang X.-K., Hoffmann B., Tran P.B.-V., Graupner G., Phahl M., *Nature*, **355**, 441 – 446, 1992.
145. Lee M.S., Kliewer S.A., Provencal J., Wright P.E., Evans R.M., *Science*, **260**, 1117, 1993
146. Rastinejad F., Perlmann T., Evans R.M., Sigler P.B., *Nature*, **375**, 203 – 211, 1995
147. Bourguet W., Ruff M., Chambon P., Gronemeyer H., Moras D., *Nature*, **375**, 375 – 377, 1995.
148. Silverman A.K., Ellis C.M., Voorhees J.J., *J. Am. Acad. Derm.*, **16**, 1027 – 1039, 1987.
149. Elias P.M. et al., *Lab. Invest.*, **44**, 531 – 540, 1981.
150. Elias P.M., *J. Am. Acad. Derm.*, **15**, 797 – 809, 1986.
151. Connor M.J., Lowe N.J., Ashton R.E., *J. Invest. Derm.*, **82**, 431 – 432, 1984
152. Connor M.J., Ashton R.E., Lowe N.J., *J. Pharmac. Exp. Ther.*, **237**, 31 – 35, 1986
153. Teelmann K., *Pharmac. Ther.*, **40**, 29 – 43, 1989.
154. Kistler A., *Roux Arch. Dev. Biol.*, **194**, 9 – 17, 1984.
155. Pedande F.J., Stoughton R., *Br. J. Derm.*, **84**, 465 – 469, 1991.
156. Papa C.M., *Acta Derm. Vener. Suppl.*, **74**, 128, 1975.
157. Strauss J.S. et al., *J. Am. Acad. Derm.*, **10**, 490 – 496, 1984.
158. Collins M.R.L., James W.D., Rodman O.G., *J. Am. Acad. Derm.*, **14**, 274, 1986.
159. Ferguson J., Johnson B.E., *Pharmac. Ther.* vol. 40. nr 1, 123-135, 1989.
160. Harber I.C., Baer R.L., *J. Invest. Derm.*, **58**, 327-342, 1972.
161. Spikes J.D., in: *The science of photomedicine*, 113-114. Regan J.D., Parrish J.A. (Eds) Plenum Press, New York, 1982.
162. Johnson G.E. et al., in: *Skin Models, Models to study Function and Disease of Skin*, 264-281, Marks R., Plewig G. (Eds), Springer-Verlag, 1986.
163. Harber L. C., Bickers D.R., *Photosensitivity Diseases. Principles of Diagnosis and Treatment*, W. B. Saunders Company, 1981.
164. Mc Kenzie R.M. et al., *J. Chromatogr.*, **155**, 379 – 387, 1978.
165. Lo K.K.N., Land E.J., Truscott T.G., *Photochem. Photobiol.*, **36**, 139 – 143, 1982.
166. Ferguson J., Johnson B.E., *British Journal of Dermatology*, **89**, 275-283, 1986
167. Hetherington A. M., Johnson B. E., *Photodermatology*, **1**, 255-260, 1984
168. Daniels F. Jr., *J. Invest. Derm.*, **44**, 259-262, 1965.
169. Teelmann K., *Drug. Dev. Res.*, **3**, 49 – 57, 1983.
170. Goodman D.S., *New Eng. J. Med.*, **310**, 1023 – 1031, 1984.
171. Nieman G., Klein-Obbig H.J., *Vitam. Horm. (N.Y.)*, **12**, 69 – 99, 1954.
172. Kretzschmar R., Leuschner F., *Acta Derm - Vener.*, **55**, 29 – 32, 1975.
173. Kamm J.J., *J. Am. Acad. Derm.*, **6**, 652 – 659, 1982.
174. Gelen J.A.G., *Crit. Rev. Toxic.*, **6**, 351 – 375, 1979.

# *Cercetări personale*

# PREPARAREA, CARACTERIZAREA ȘI EVALUAREA ACȚIUNII ȘI TOLERANȚEI CUTANATE A UNUI DERMOPREPARAT CU ACID RETINOIC INCLUS ÎN LIPOZOMI

## 2.1. Prepararea și caracterizarea unor lipozomi cu acid retinoic all-trans (tretinoin)

### 2.1.1. Introducere

Lipozomii, una dintre cele mai studiate forme de transportori medicamentoși la țintă sunt vezicule simple, artificiale, formate dintr-un înveliș fosfolipidic bistratificat, și au mărimea cuprinsă între 20 și 3500 nm.

Materiile prime utilizate la prepararea lipozomilor sunt fosfolipide, colesterol, substanțe ionice pentru a conferi o sarcină electrică (stearilamina sarcina pozitivă, acizii fosfatidici - sarcina negativă). Dintre fosfolipide cel mai frecvent se utilizează fosfatidilcolinele naturale (lecitine de soia sau de gălbenuș de ou) sau sintetice (dipalmitoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcoline). Sunt utilizate și sfingomielină, fosfatidilserina, fosfatidilinozitol. În structura membranei lipozomilor se poate încorpora și colesterol până la o concentrație molară de 50% sau chiar în cazul proporției molare de 2 : 1 pentru asocierea colesterol: fosfatidilcolina.

Lipozomii multilamelari MLV (multilamellar vesicle) alcătuiți din mai multe rânduri de lamele concentrice se obțin în mod obișnuit prin hidratarea cu o soluție apoasă tamponată (ce conține substanța medicamentoasă hidrosolubilă) a unui film lipidic depus pe pereții unui vas de sticlă. Lipozomii unilamelari mici (SUV) se obțin din MLV prin ultrasonicare. Ei sunt considerați cei mai stabili lipozomi dar au cel mai redus volum al fazei apoase.

Lipozomii unilamelari mari (LUV) se prepară cel mai frecvent prin tehnica evaporării în fază inversă, când poartă denumirea de REV (reverse phase evaporation vesicle). Acest tip de lipozomi încorporează cel mai mare volum de fază apoasă/mg lipide și deci cea mai mare cantitate de substanțe medicamentoase hidrosolubile. Separarea lipozomilor de soluția apoasă

neîncapsulată se poate realiza fie prin trecerea dispersiei lipozomiale printr-o coloană cromatografică (Sephadex) sau prin dializă<sup>1,2,3,4,5</sup> uneori prin centrifugare.

Formarea lipozomilor se datorează proprietății fosfolipidelor, cu o structură moleculară amfionică, de autoasociere, cu formarea unor structuri supramoleculare caracteristice. În lipozomii multilamelari, aranjamentul spațial al straturilor lipidice este rezultatul unui echilibru între forțele Van der Waals (forțe de atracție) și forțele de respingere electrostatice și de hidratare.

Fiecărei specii lipidice pure îi corespunde o temperatură de tranziție ( $T_c$ ) între starea lichidă și cristalină la care lanțurile lipidice suferă o schimbare endotermică de la o conformație cvasi-cristalină la una în care lanțurile au o mobilitate mult mai mare. În general, creșterea lungimii lanțurilor sau a saturării acestora determină o creștere a temperaturii de tranziție. Pentru membranele lipozomiale din lecitina de ou  $T_c$  este cuprins între  $-15^\circ\text{C}$  și  $-7^\circ\text{C}$  iar pentru lanțurile lipidice saturate, formate din 14-16 atomi de carbon  $T_c$  este în domeniul fiziologic<sup>6,7</sup>. Înțelegerea tranzițiilor de fază și a fluidității membranelor fosfolipidice este importantă atât pentru prepararea cât și pentru utilizarea lipozomilor întrucât comportamentul de fază al membranei lipozomiale determină proprietățile sale importante: permeabilitatea, fuziunea, agregarea și fixarea de proteine care influențează semnificativ stabilitatea lipozomilor și comportamentul lor în sisteme biologice.

Prin includerea colesterolului în structura peretelui fosfolipidic este influențată rigiditatea acestuia. Efectul este determinat de starea inițială a membranei: dacă membrana este în stare de gel (stare "solidă") colesterolul se inserează în proximitatea grupărilor polare și determină creșterea fluidității catenelor lipidice; dacă membrana este în stare "fluidă" (crystal state) colesterolul se inserează între catenele lipidice determinând o creștere a compactității peretelui lipidic.

Suspensia lipozomială nu este stabilă ceea ce determină o stabilitate a lipozomilor limitată în timp. Fosfolipidele lipozomiale pot suferi in vitro degradări (chimice sau fizice) de tipul oxidare, hidroliză, agregarea veziculelor, fuzionare sau pierderea substanței active încorporate. Stabilitatea lipozomilor este influențată de natura fosfolipidelor, tipul de lipozomi, prezența colesterolului, includerea în formulare a unui chelator pentru fier (previne inițierea reacțiilor în lanț datorate radicalilor liberi) sau a unui antioxidant (vitamina E), păstrarea suspensiei de lipozomi în atmosferă inertă (azot).

Permeabilitatea membranei lipozomiale depinde în mare măsură de compoziția lipidică cât și de substanța încorporată. Astfel moleculele ionice sau polare sunt mai bine reținute în lipozomi decât compușii lipofili cu G.M. mică. În ambele cazuri inserarea colesterolului în structura membranei lipozomiale crește stabilitatea acesteia, diminuând astfel pierderea conținutului medicamentos inclus în ea.

Producerea industrială a lipozomilor este limitată îndeosebi de absența unei metode de conservare corespunzătoare. O metodă adecvată pentru a asigura o mai bună stabilitate lipozomilor este liofilizarea. Protejarea lipozomilor s-a realizat cu substanțe crioprotectoare: glicerină, DMSO, manitol. Totuși până în prezent, nu au fost perfecționate pe deplin tehnici care să prevină fracturarea membranei lipozomiale.

În acest studiu s-a urmărit prepararea de lipozomi din fosfatidilcolină (lecitină) asociată sau nu cu colesterol, încărcăți cu acid retinoic și caracterizarea lor din punct de vedere al mărimii, aspectului, al factorilor care influențează încorporarea acidului retinoic și al stabilității<sup>8</sup>.

## **2.1.2. Metoda de preparare**

### **2.1.2.1. Materiale și metode**

#### **MATERIALE:**

- Acid retinoic all-trans (tretinoin) - pulbere (Hoffmann La Roche)
- Lecitina de soia - (fosfatidilcolina) (Epikuron 200) (Lucas Mayer GmbH)
- Colesterol (Merck)
- coloana cromatografică Sephadex G-50
- metanol absolut
- tampon fosfat salin (pH = 7,4).

#### **APARATURA:**

- Rotavapor (Büchi)
- baie cu ultrasunete: Bransonic 5 (Cole Palmer)
- agitator - vibrator: Vortex Genie (Sci. Ind. Inc.)
- microscop electronic de transmisie: Tesla BS - 340.

### **2.1.2.2. Modul de lucru**

#### **Prepararea lipozomilor multilamelari (MLV)**

Lipozomii multilamelari (MLV) s-au obținut după metoda lui Bangham<sup>9</sup>.

Obținerea filmului de lipide.

0,03 g acid retinoic (tretinoin) - pulbere (Hoffmann La Roche) s-a dizolvat în 30 ml metanol absolut apoi s-a adăugat 0,3 g lecitină (la care uneori s-a adăugat și colesterol - Merck) într-un balon de sticlă cu fund rotund de 1 l, agitându-se soluția de lipide până la dizolvarea completă a componentelor. S-a atașat apoi balonul la un evaporator rotativ, rotavapor - Büchi (cu o viteză de rotație de 60 r.p.m.), apoi s-a imersat în baia de apă termostată la 40°, sub presiune redusă. După o oră, prin evaporarea solventului s-a depus pe pereții balonului de sticlă cu fund rotund un film subțire uscat lipidic.

#### **Hidratarea lipidelor**

S-a detașat balonul de la evaporatorul rotativ iar filmul lipidic uscat obținut s-a hidratat cu 5 ml de soluție tampon fosfat (pH = 7,4 izotonizată cu clorură de sodiu). S-a continuat agitarea încă 30 minute la 30°C. Dispersarea lipozomială s-a continuat cu un agitator - vibrator Vortex Genie timp de 5 minute. A rezultat o dispersie de lipozomi multilamelari (MLV) cu aspectul de suspensie alb-lăptoasă, omogenă, fără particule vizibile.

#### **Veziicule sonicate (SUV)**

Pentru reducerea dimensiunilor lipozomilor și transformarea în lipozomi mici unilamelari dispersia obținută de MLV s-a supus ultrasonicării (Bransonie - 5) într-o baie cu ultrasunete. Ultrasonicarea s-a efectuat timp de 20 minute.

#### **Separarea de acidul retinoic neîncapsulat**

Separarea lipozomilor de acidul retinoic neîncapsulat s-a făcut prin filtrarea pe gel de Sephadex G-50 plasat într-o coloană de sticlă cu diametrul de 2,5 cm și lungimea de 10 cm, eluarea realizându-se cu tampon fosfat salin. Pentru 1 ml dispersie primară depusă pe gel s-au folosit 10 ml tampon fosfat izotonic. Eluatul s-a colectat în fracțiuni de câte 1 ml. Lipozomii s-au colectat în fracțiunile de 1 ml în care s-a evidențiat prezența turbidității. Acestea au fost de regulă între fracțiunile 3-6 cu un total de aproximativ 3-4 ml dispersie de lipozomi.



Schema preparării lipozomilor cu acid retinoic este prezentată în fig. 2.1.

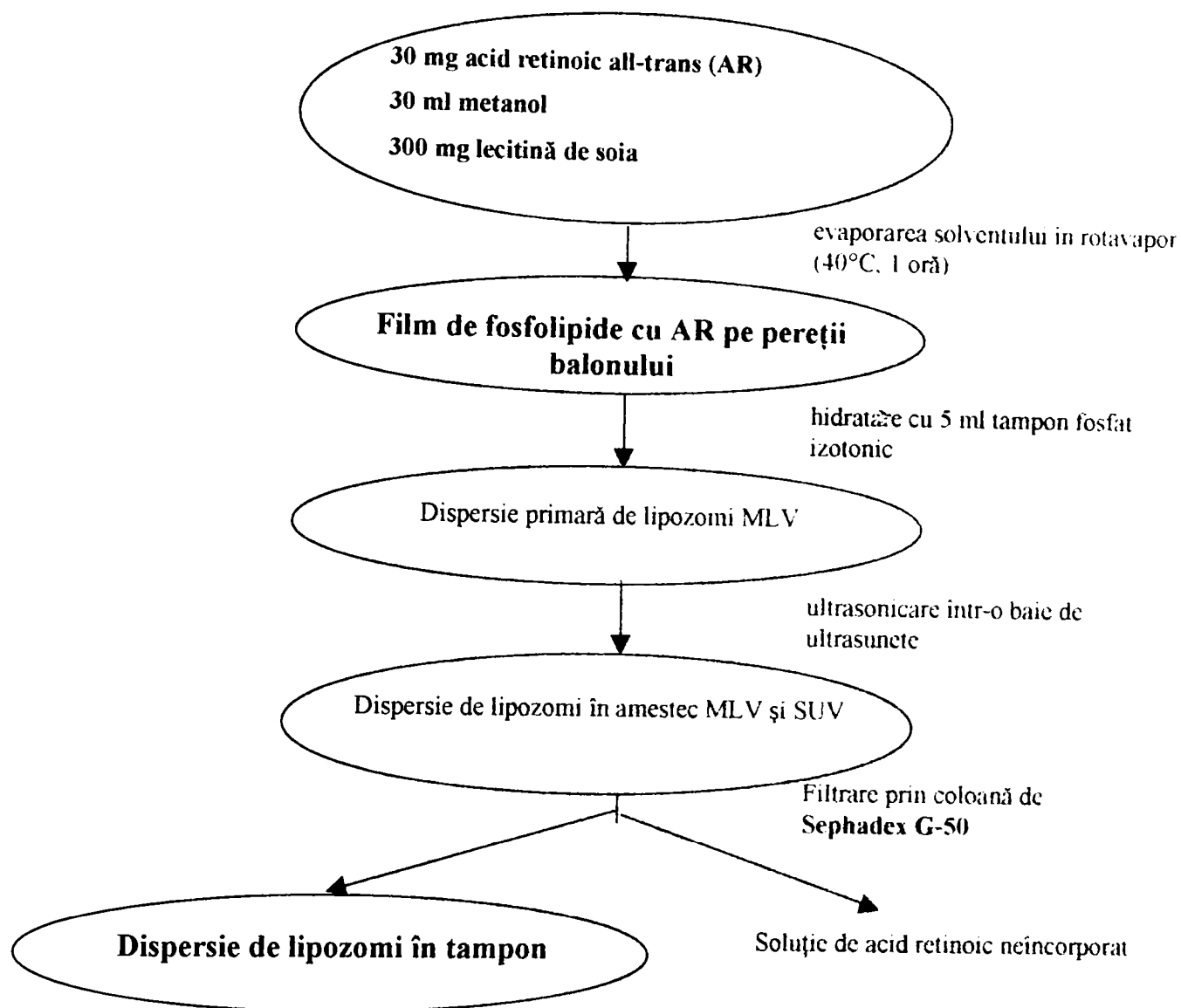


Fig. 2.1. Schema preparării lipozomilor cu acid retinoic.

### 2.1.2.3. Rezultate și discuții

Lipozomii obținuți prin metoda expusă se prezintă sub forma unei dispersii apoase opalescente.

Prin creșterea timpului de ultrasonicare (la 30 minute) opalescența se reduce datorită reducerii dimensiunii veziculelor. Prin examinarea la microscopul electronic se observă că forma lipozomilor este aproape sferică. Diametrul mediu calculat cu ajutorul formulei:

$$\bar{d} = \sum \frac{dn}{n}, \text{ n = număr de vezicule citite}$$

indică o scădere a diametrului mediu, cu prelungirea timpului de ultrasonicare.



*Fig. 2.2. Imagine la microscopul electronic de transmisie a lipozomilor cu acid retinoic (x 70.000).*

#### Determinarea mărimii lipozomilor

Mărimea lipozomilor s-a măsurat la microscopul electronic de transmisie (Tesla BS-340) tehnică considerată destul de laborioasă dar prin care se pot obține prin observarea directă a lipozomilor, informații exacte asupra profilului populației lipozomiale cuprinzând o gamă largă de mărimi<sup>10,11,12</sup>.

Dispersia lipozomială a fost depusă sub forma unei picături, pe grile ale microscopului electronic (200-300 mesh) acoperite cu o peliculă din colodiu și carbon. Pentru fiecare probă de dispersie lipozomială s-au utilizat 2-3 grile. Pe grila prinsă cu pensete se depune o picătură de suspensie lipozomială - metoda picăturii<sup>9</sup>. Excesul de soluție tampon este îndepărtat cu o hârtie de filtru. Lipozomii sunt contrastați cu tetraoxid de osmiu (0,5% în 5mM Hepes, 150mM NaCl, 1mM EDTA, pH = 7,4) timp de 15-20 minute apoi cu acetat de uraniu (1% în apă bidistilată) pentru 15-20 minute. După uscare, grila a fost examinată la microscopul electronic și s-au realizat fotografiile ale lipozomilor cu acid retinoic (70.000 x), o fotografie fiind prezentată în fig. 2.2. Mărimea lipozomilor a fost măsurată pe fotografiile realizate.

Clasele granulometrice de lipozomi în dispersia apoasă inițială lipozomială și după etapa de sonicare sunt prezentate în fig. 2.3 și respectiv fig. 2.4, reprezentând procentul de lipozomi (%) de diferite mărimi, numărate pe minimum 100 particule.

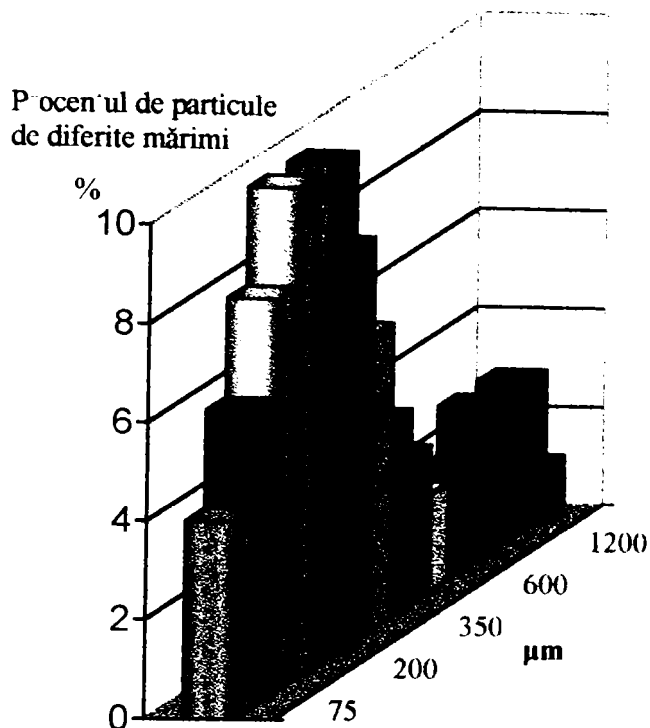


Fig. 2.3 Clasele granulometrice în dispersia inițială lipozomială.

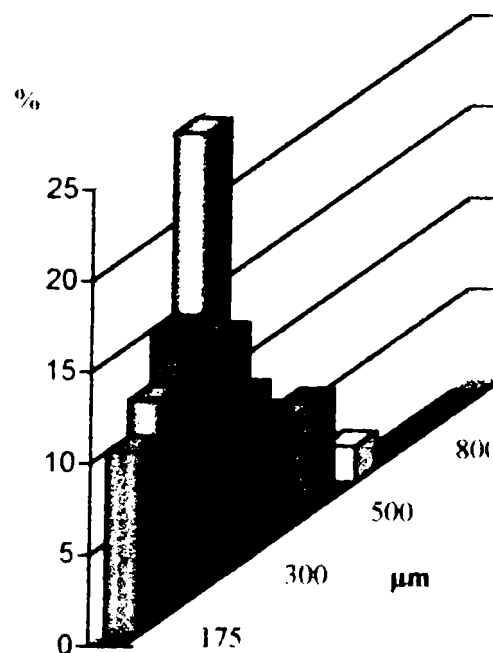


Fig. 2.4 Clasele granulometrice în dispersia lipozomială după sonicare.

Sonicarea determină conversia veziculelor lipozomiale mari (diametrul mediu 450 nm) în vezicule mai mici (diametrul mediu 350 nm) și concomitent și o diminuare a polidispersiei veziculelor. Date similare au fost raportate și de Laham și colab.<sup>13</sup>.

### 2.1.3. Studiul factorilor care influențează încorporarea acidului retinoic în lipozomi.

Acidul retinoic all-trans fiind o substanță liposolubilă este încorporată în lipozomi în faza lipidică a veziculei.

S-a studiat încorporarea acidului retinoic în funcție de următorii factori: raportul molar acid retinoic/fosfatidilcolina (AR/Fc) și raportul molar fosfatidilcolină/colesterol (Fc/Co).

S-a cercetat de asemenea și influența concentrației dispersiei lipozomiale inițiale asupra încorporării acidului retinoic în lipozomi.

### 2.1.3.1. Materiale și metode

S-au folosit toate materialele și aparatura de la punctul 2.1.2.1. la care s-au adăugat:

#### MATERIALE:

- HCl concentrat
- HClO<sub>4</sub> concentrat
- Molibdat de amoniu 2,5%
- Acid ascorbic 1%

#### APARATURA:

- etuva - la 180°C
- spectrofotometru UV-VIS ULTROSPEC III (Pharmacia LKB).

Mod de lucru:

S-au preparat lipozomi în următoarele variante:

- trei raporturi molare Fc/AR: 1,27 : 0,36  
0,63 : 0,36  
0,25 : 0,36

(fără colesterol și fără ultrasonicare)

- trei raporturi molare Fc/Co/AR: 1,27 : - : 0,36  
1,27 : 0,20 : 0,36  
0,55 : 0,48 : 0,36

După prepararea lipozomilor și îndepărtarea solutului neîncorporat s-a determinat acidul retinoic încapsulat.

În scopul evaluării eficienței încorporării se disting 2 parametri: primul, volumul de lichid încapsulat/mM lipide (calculat cu ecuația 2.1), iar al doilea, procentul de substanță medicamentoasă încorporată în lipozomi (calculat cu ecuația 2.2).

Pentru caracterizarea încorporării substanțelor active în lipozomi se folosesc mai multe ecuații:

Primul parametru definit prin capacitatea de încapsulare (C.I.) este funcție de mărimea lipozomilor și numărul de lamele/particulă. C.I. reprezintă fracția volumului apos încorporat/mM lipide și se calculează cu ecuația 2.1<sup>14</sup>:

$$C.I. = \frac{C_f}{C_i} \times V/C_l \quad (2.1)$$

unde C.I. = capacitatea de încapsulare (fracția volumului fazei apoase încorporate/mM de lipide) (ml/mM);

$C_i$  = concentrația inițială a tretinoinului (AR)

$C_f$  = concentrația finală a tretinoinului (AR)

$C_l$  = concentrația de lipide în lipozomi.

Pentru calcularea încorporării tretinoinului în lipozomi se poate evalua eficiența procentuală a încorporării față de cantitatea inițială luată în lucru (ecuația 2.2):

$$I.R. = \frac{C_f}{C_i} \times 100 \quad (2.2)$$

unde I.R. = încorporarea relativă (%).

$C_f$  = concentrația finală a tretinoinului în dispersia de lipozomi după filtrarea pe Sephadex G-50.

$C_i$  = concentrația inițială a tretinoinului luată în lucru, în dispersia primară de lipozomi înaintea separării fracțiunii neîncorporate pe Sephadex G-50.

Eficiența încorporării (E.I.) depinde de C.I. dar se poate determina numai după ce se cunoaște și concentrația de lipide în lipozomi (ecuația 2.3):

$$E.I. = \frac{W_t}{W_t + W_l} \times 100 \quad (2.3)$$

unde E.I. = eficiența încorporării (%).

$W_t$  = cantitatea de tretinoin încapsulată în lipozomi.

$W_l$  = cantitatea de lipide care formează membrana bistratificată găsită experimental în lipozomi.

#### Determinarea cantitativă a acidului retinoic în lipozomi

Se măsoară exact o cantitate de 10  $\mu$ l dispersie de lipozomi și se adaugă 2 ml metanol absolut. Are loc dizolvarea peretelui fosfolipidic al lipozomilor și totodată a substanței medicamentoase. S-a determinat extincția la spectrofotometru UV-VIS Ultrospec III față de metanol, la 341 nm. Extincția probelor s-a convertit în concentrații cu ajutorul curbei de etalonare obținută cu valori cunoscute de concentrație a tretinoinului între 1-10  $\mu$ g/ml în metanol absolut. Valorile concentrațiilor menționate sunt media a trei probe diferite.

Curba de etalonare a tretinoinului în metanol are următoarea ecuație și este prezentată în fig. 2.5.

$$y = 0.1372x - 0.025 \quad R^2 = 0.9938$$

unde  $y$  = absorbția;

$x$  = concentrația ( $\mu$ g/ml)

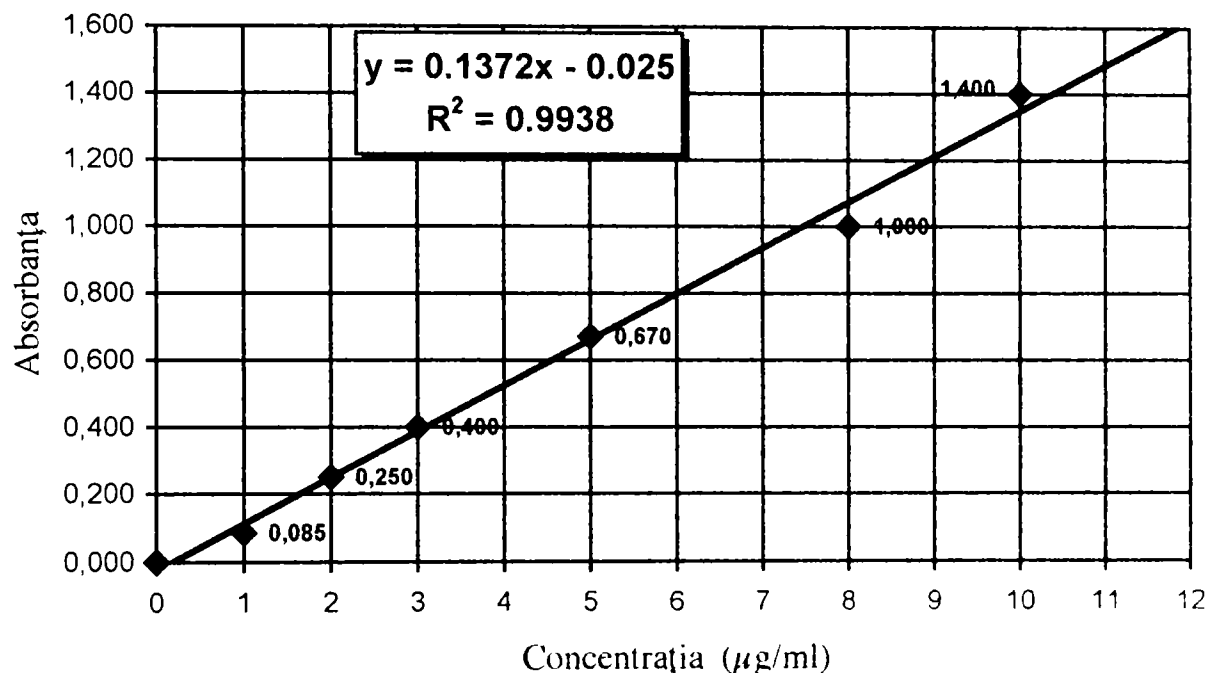


Fig. 2.5 Curba de etalonare pentru acid retinoic în metanol

#### Dozarea fosfatidilcolinei din lipozomi

S-a utilizat o variantă a metodei Fiske-Subbarrow<sup>15</sup> care constă în dozarea fosforului anorganic după mineralizarea fosfolipidelor și efectuarea unei reacții de culoare urmată de măsurarea fotocolorimetrică<sup>16</sup> a extincției compusului albastru care se formează:



Pentru fiecare probă, etapele dozării au fost următoarele: s-au luat 0.02 ml (20 μl) dispersie lipozomială la care s-au adăugat 480 μl apă și 0.5 ml HCl concentrat; proba se lasă apoi într-o etuvă la 180°C pentru evaporare la sec; peste reziduiul răcit la temperatura camerei se adaugă 0.3 ml HClO<sub>4</sub> concentrat și se mai lasă 20 minute în etuvă la 180°C; în final se mai adaugă 2.7 ml apă, 0.3 ml soluție molibdat de amoniu 2.5% și 0.2 ml acid ascorbic 1% (preparat extemporaneu). Pentru formarea complexului, se indică menținerea probei timp de 10 minute într-o baie de apă la 100°C când se dezvoltă culoarea albastră; după răcire, se completează cu apă la 10 ml și se citește extincția la 700 nm în cuva de 1 cm față de apă distilată.

Curba de etalonare fig. 2.6 se întocmește folosind Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O ca sursă de fosfat anorganic, în concentrații cuprinse între 1-7 μg/ml ecuația dreptei fiind:

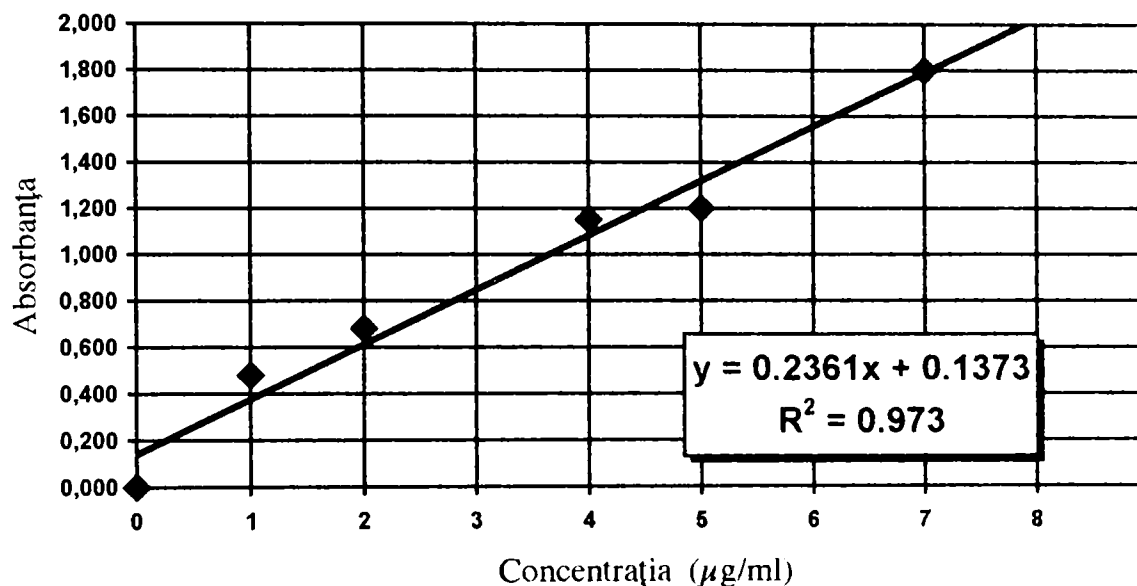


Fig. 2.6 Curba de etalonare pentru dozarea fosforului

Determinarea concentrației de fosfatidilcolină se face pe baza corespondenței: 2.5 μg fosfat anorganic - 65 μg fosfatidilcolina.

### 2.1.3.2. Rezultate și discuții

În tabelul 2.1 este prezentat efectul creșterii proporției de fosfatidilcolină asupra încorporării acidului retinoic în lipozomi:

Tabelul 2.1  
Efectul raportului molar Fc/AR asupra încorporării acidului retinoic în lipozomi

RAPORTUL MOLAR Fc/RA	I.R. <sup>a</sup> (% = eficiența relativă a încorporării acidului retinoic)	C.I. <sup>b</sup> (ml/mM)	E.I. <sup>c</sup> (fracția molară de acid retinoic/mol lipide %)
0.25 : 0.36	19.7	0.3	0.41
0.63 : 0.36	27.8	0.55	0.72
1.27 : 0.36	29.7	1.1	2

a: calculată cu ecuația 2.2; b: calculată cu ecuația 2.1; c: calculată cu ecuația 2.3.

Efectul concentrației de fosfatidilcolină inițială asupra fracției molare medicament încorporat/mol lipide (E.I.) și asupra capacității de încapsulare C.I. (ml/mM) sunt prezentate în fig. 2.7.

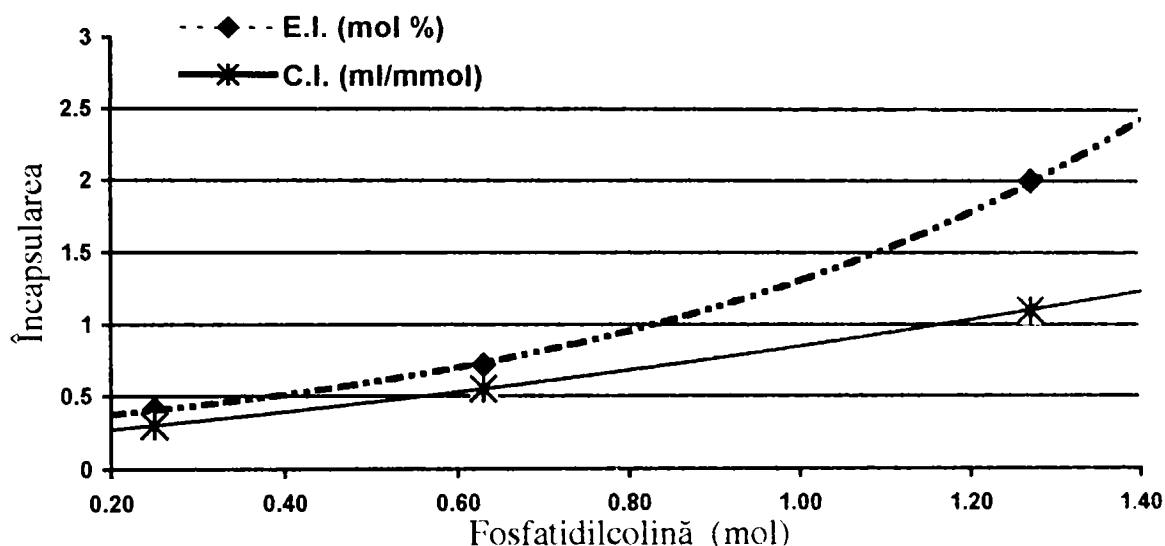


Fig. 2.7 Influența concentrației inițiale de fosfatidilcolină asupra eficienței de încapsulare (E.I.) și asupra capacității de încapsulare (C.I.) a acidului retinoic în lipozomi

Prin creșterea raportului Fc/AR se obțin dispersii de lipozomi ce conțin cantități crescânde de acid retinoic. Parametrul care ilustrează cel mai bine acest aspect este I.R. (reprezintă procentul de substanță medicamentoasă care se regăsește în dispesia finală față de cantitatea de medicament introdusă la preparare, deci, eficiența încorporării). Astfel prin mărirea cantității de Fc. de 1.44 ori cantitatea de acid retinoic crește de 1.41 ori iar prin mărirea de 5 ori a cantității de Fc. cantitatea de acid retinoic crește de 1.5 ori. Faptul constatat este explicabil deoarece cu cât cantitatea de fosfatidil colină este mai mare se pot forma mai multe vezicule de lamele care vor îngloba o cantitate mai mare dar totuși limitată de acid retinoic în faza lipidică. Efectul fosfatidilcolinei asupra eficienței încapsulării a fost raportat și de alt studiu<sup>17</sup>.

Efectul concentrației colesterolului asociat la structura învelișului fosfolipidic în dispersia inițială lipidică, asupra eficienței de încapsulare (I.R.) a acidului retinoic în lipozomi este redat în tabelul 2.2.

Tabelul 2.2

Efectul raportului molar Co/Fc asupra încorporării relative (I.R.) a acidului retinoic în lipozomi

Fosfatidilcolina	1.27	1.27	0.55
Colesterol	-	0.20	0.48
Acid retinoic	0.36	0.36	0.36
I.R. (%) (+- D.S.)	29.7 (1.5)	24 (1.3)	15.4 (0.4)



Prin asocierea colesterolului în structura învelișului fosfolipidic al lipozomilor a scăzut cantitatea de acid retinoic încorporat în vezicule. Creșterea concentrației de colesterol față de concentrația de Fc. în lipozomi a determinat chiar o scădere semnificativă a cantității de acid retinoic încorporat. Această observație este în concordanță cu datele raportate asupra scăderii capacității de încapsulare a hidrocortizonului și dexametazonei palmitat la asocierea colesterolului în structura membranei de fosfatidilcolină a lipozomilor<sup>18</sup>. Acest rezultat ar putea fi explicat prin prezența unei grupări polare în structura moleculară a medicamentelor amintite. Încorporarea colesterolului s-a demonstrat a fi benefică pentru creșterea stabilității fizice a veziculelor lipozomiale comparativ cu cele formate numai din fosfatidilcolină. În cazul acidului retinoic includerea colesterolului în membrana lipozomială diminuează probabil solubilitatea în membrana lipidică a medicamentului parțial polar.

Eficiența încapsulării acidului retinoic în dispersia lipozomială inițială cât și în dispersia lipozomială concentrată la Rotavapor pentru a avea o concentrație mai mare de acid retinoic în vederea realizării de preparate farmaceutice este redată în tabelul 2.3.

Tabelul 2.3

*Eficiența încapsulării acidului retinoic în dispersia lipozomială inițială și concentrată (%)*

Compoziția amestecului inițial	I.R. (%) în dispersia inițială	I.R. (%) în dispersia concentrată
Fosfatidilcolina: acid retinoic (1.27 : 0.36 mol:mol)	29.7	35.5

I.R. = eficiența încapsulării (%) calculată cu ecuația 2.2.

Procentul eficienței de încapsulare este practic puțin modificat în dispersia lipozomială după evaporarea solventului sub presiune redusă, în comparație cu cea existentă în dispersia lipozomială inițială.

#### 2.1.4. Studiul stabilității lipozomilor cu acid retinoic

S-a ales ca și criteriu de evaluare al stabilității lipozomilor, cantitatea de acid retinoic rămasă încapsulată, după anumite intervale de timp. Ca factor care influențează stabilitatea lipozomilor s-a studiat raportul molar Fc/AR.

#### 2.1.4.1. Materiale și metode

S-au folosit aceleași materiale și metode ca și la punctele 2.1.2.1. și 2.1.3.1. necesare preparării lipozomilor, dozării acidului retinoic și fosfatidilcolinei.

Dispersiile de lipozomi s-au păstrat în tampon fosfat izoton pH = 7.4, la temperatura camerei, la întuneric, 4 săptămâni. După prima, a doua și a patra săptămână, dispersiile au fost trecute prin coloana de Sephadex și în dispersia colectată s-a dozat acidul retinoic.

Considerând că la începutul studiului cantitatea de acid retinoic încorporat a fost de 100%, după intervalul precizat mai sus s-a calculat încorporarea relativă față de această cantitate (I.R.).

#### 2.1.4.2. Rezultate și discuții

Scăderea conținutului de acid retinoic din lipozomii preparați cu diverse concentrații de fosfatidilcolină față de concentrația de AR este prezentată în tabelul 2.4 și figura 2.8 sub forma evoluției încorporărilor relative (I.R.) în funcție de timp.

*Tabelul 2.4*

*Scăderea conținutului de acid retinoic*

Fosfatidilcolina : acid retinoic (raport molar)	I.R. inițial	I.R. după 1 săptămână	I.R. după 2 săptămâni	I.R. după 1 lună
1.27 : 0.36	29.7	27.3	25.5	20.8
0.63 : 0.36	27.8	25.1	22.2	16.6
0.25 : 0.36	19.7	14.5	7.9	3.0

Din analiza datelor obținute, rezultă că lipozomii pierd în timp o anumită cantitate de medicament încorporat. Lipozomii preparați cu concentrația de lipide mai mare, deci prin creșterea raportului Fc/AR, au prezentat o scădere mai mică a conținutului medicamentos față de alte formulări, deci o creștere a stabilității.

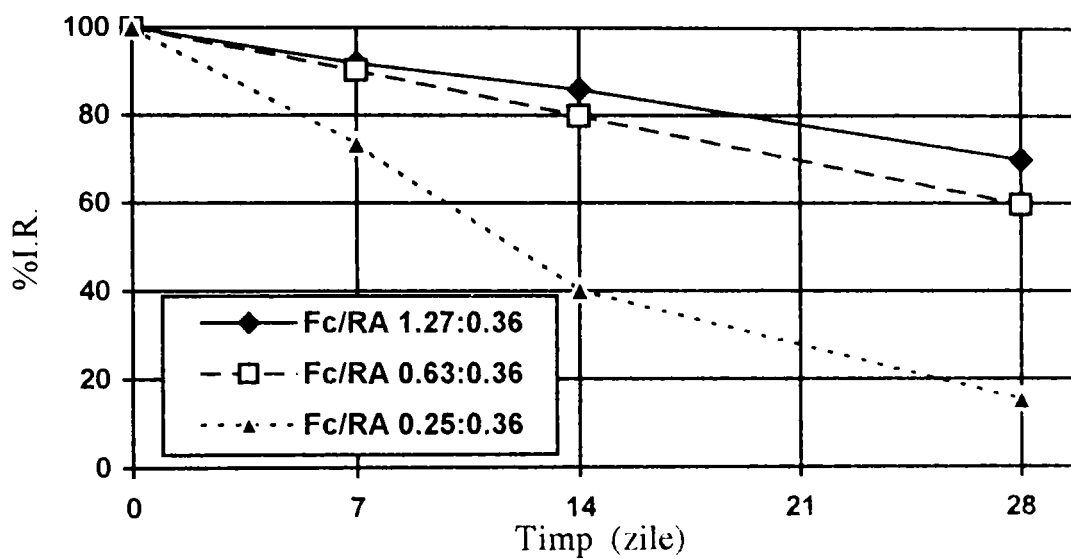


Fig. 2.8 Efectul raportului molar Fc/AR asupra stabilității lipozomilor

Scăderea cantității de substanță medicamentoasă din lipozomi în timp, a fost raportată și de alți autori<sup>19</sup>. Astfel, prin mărirea de 5 ori a raportului Fc/AR după 4 săptămâni rămâne încapsulată o cantitate de acid retinoic de 4.6 ori mai mare.

### 2.1.5. Concluzii

S-au preparat lipozomi din fosfatidilcolină încorporați cu acid retinoic all-trans (tretinoin) prin metoda hidratării filmului fosfolipidic (MLV) și prin ultrasonicare (SUV). Examinarea la microscopul electronic a relevat o formă relativ sferică a veziculelor lipozomiale cu un diametru mediu de 450 nm. Prin ultrasonicare diametrul mediu scade datorită proporției de lipozomi mici și în același timp se reduce polidispersia veziculelor.

S-a dovedit că încorporarea acidului retinoic (AR) care se realizează în compartimentul lipidic al lipozomilor este dependentă de raportul molar Fc/AR. Creșterea proporției de fosfatidilcolina față de acidul retinoic determină volume apoase mai mari (creșterea capacității de încapsulare), creșterea eficienței încorporării relative precum și creșterea fracției molare a medicamentului încapsulat/mol de lipide sau a conținutului de medicament în lipide.

S-a pus în evidență stabilitatea în timp a lipozomilor cu acid retinoic păstrați sub formă de dispersie apoasă. Stabilitatea scade în timp și poate fi îmbunătățită prin creșterea raportului Fc/AR și prin asocierea colesterolului la învelișul lipozomial.

## 2.2 Formularea unui hidrogel de uz topic conținând lipozomi cu acid retinoic

### 2.2.1. Introducere

Acidul retinoic (tretinoinul) se utilizează în diferite formulări topice pentru tratamentul acneei<sup>20,21,22</sup>, al unor forme de psoriazis<sup>23</sup> și de cancer al pielii<sup>23</sup> (melanoame) precum și în cosmetologie pentru efectul de profilaxie a îmbătrânirii pielii. Utilizarea clinică a tretinoinului este totuși limitată deoarece aplicarea sa cutanată este deseori însoțită de iritarea și deshidratarea pielii.

Administrarea topică a lipozomilor reprezintă una din modalitățile preferate de utilizare a acestora, datorită prezenței substanței medicamentoase încorporate în lipozomi în vecinătatea locului de aplicare. Aceasta poate crește durata și intensitatea acțiunii concomitent cu reducerea sau eliminarea efectelor sistemice și ale efectelor adverse locale<sup>24</sup>. Natura lipofilă a lipozomilor le oferă posibilitatea acoperirii pielii cu un film lipidic, contribuind la hidratarea acesteia, și la o penetrare crescută a substanței medicamentoase lipofile incluse în lipozomi, pe calea pilosebacee<sup>25,26,27</sup>, dar și la reținerea substanței medicamentoase la suprafața pielii, reducând efectele sistemice și acționând ca un rezervor medicamentos care prelungește cedarea<sup>28</sup>. Unii cercetători afirmă că lipozomii rămân la suprafața pielii și nu penetrează stratul cornos<sup>29</sup>, în timp ce alte cercetări mai recente<sup>27</sup> indică convingător că lipozomii traversează totuși stratul cornos prin calea foliculară<sup>27</sup>.

În acest studiu s-a preparat o dispersie lipozomială cu acid retinoic care s-a evaluat ca atare și care s-a încorporat într-un hidrogel destinat aplicării locale, pentru a putea studia acțiunea sa în comparație cu un produs care conține acid retinoic liber neîncorporat în lipozomi. S-a evaluat preparatul sub aspectul conținutului în acid retinoic, al stabilității și al caracteristicilor reologice<sup>30</sup>. Motivația alegerii hidrogelului ca formă de dermopreparat este dată de caracterul plastic al hidrogelului de acid poliacrilic (Carbopol) cu posibilitatea etalării pe tegument, capacitatea potențial crescută de cedare a unor componente lipidice medicamentoase precum și a caracteristicilor organoleptice convenabile ale preparatului.

## 2.2.2. Materiale și metode

*Materiale:* - acid retinoic all-trans, pulbere (Hoffman La Roche);  
- lecitina de soia - fosfatidilcolina (Epikuron 200) (Lucas Mayer GmbH);

- methocel K4 - (Colorcon) (Orpington);
- acid poliacrilic - (Carbomer 934 P) (B.F.Goodrich);
- toți ceilalți reactivi folosiți au fost de puritate analitică.

*Aparatura:* - Rotavapor (Büchi);

- Baie cu ultrasunete: Bransonic 5 (Cole Palmer);
- Agitator - vibrator: Vortex Genie (Sci. Ind. Inc.);
- Etuvă la 180°C;
- Spectrofotometru UV-VIS: Ultrospec III (Pharmacia LKB);
- Vâscozimetru rotațional: Rheotest.

### Metode:

#### Prepararea și caracterizarea lipozomilor cu acid retinoic

##### Prepararea lipozomilor:

Lipozomi multilamelari (MLV) s-au realizat prin metoda prezentată detaliat la punctul 2.1.2. Pe scurt, prepararea s-a efectuat în modul următor:

Tretinoinul și lecitina s-au asociat în proporție de 1 : 10 (greutate g/g) corespunzătoare unui raport molar 1,27 : 0,36. Amestecul de lipide cu substanța medicamentoasă s-a dizolvat în metanol absolut și s-a depus sub forma unui film subțire pe pereții unui balon de sticlă cu fund rotund, prin evaporarea solventului sub presiune redusă, la 30° C, utilizând un evaporator rotativ, Rotavapor (Büchi).

S-au adăugat 5 ml soluție tampon fosfați (pH = 7,4) izotonizată cu clorură de sodiu, continuând agitarea 30 de minute la 30° C. Dispersarea a continuat cu cun agitator vibrator Vortex Genie – 2, timp de 5 minute. S-a procedat apoi la convertirea lipozomilor multilamelari în lipozomi mai mici prin ultrasonicare (Bransonic 5 – Cole Palmer). Ultrasonicarea s-a efectuat timp de 20 de minute. Separarea lipozomilor de excesul de acid retinoic neîncorporat s-a făcut prin filtrare pe gel de Sephadex G-50, plasat într-o coloană de sticlă cu diametrul de 2,5 cm și lungimea de 10 cm. Pentru un ml dispersie primară depusă pe gel s-au folosit 10 ml tampon fosfat izotonic. Eluatul s-a recoltat în fracțiuni de câte 1 ml.

Lipozomii s-au recoltat din fracțiunile de 1 ml în care s-a identificat prezența turbidității. Acestea au fost aproximativ între fracțiunile 3 – 6, cu un total de aproximativ 3 – 4 ml dispersie de lipozomi.

#### Eficiența încorporării acidului retinoic în lipozomi:

S-a evaluat eficiența încapsulării acidului retinoic prin calculul următorilor parametri: I.R. = încorporarea relativă (%), C.I. = capacitatea de încapsulare (ml/mmol) și E.I. = eficiența încorporării (%) cu formulele prezentate la pct. 2.1.3.

#### Determinarea conținutului de lipide în lipozomi:

S-a realizat folosind o variantă<sup>16</sup> a metodei Fiske-Subbarow<sup>15</sup>, dozarea realizându-se prin metoda prezentată la pct. 2.1.3. Lipozomii liberi și cei încărcți cu acid retinoic au prezentat aceeași cantitate de fosfatidilcolină pe ml dispersie lipozomială.

#### Determinarea cantitativă a acidului retinoic în lipozomi:

S-a măsurat o cantitate de 10  $\mu$ l dispersie lipozomială și s-au adăugat 2 ml metanol absolut. S-a dizolvat astfel, atât peretele fosfolipidic al lipozomilor, cât și acidul retinoic. S-a determinat extincția la spectrofotometrul UV-Vis Ultrospec III (Farmacia LKB) față de metanol, la 341 nm. Extincția probei s-a convertit în concentrație cu ajutorul curbei de etalonare corespunzătoare, realizată pentru acid retinoic în metanol.

### **Prepararea și caracterizarea hidrogelului cu acid retinoic inclus în lipozomi**

#### Prepararea hidrogelului cu lipozomi:

S-a preparat un hidrogel prin dispersarea și îmbibarea a 1 g (1%) hidroxipropilmetil-celuloză (Methocel) în 40 g apă fierbinte (80°C) conținând și un conservant (nipagin 0,015%). S-a lăsat în repaus timp de 10 minute. Separat s-a presărat 0,5 g (0,5%) acid poliacrilic (Carbopol 934 P) la suprafața apei încălzite și s-a lăsat la îmbibare timp de o oră. După îmbibare s-a neutralizat acidul poliacrilic cu trietanolamină până la pH = 7. S-a adus amestecul de Methocel și Carbopol în baia de gheață pentru aproximativ 40 minute, apoi s-a adăugat propilenglicol 15% și bisulfid de sodiu 0,1%. În final, s-a adăugat în

cantități mici, cantitatea calculată din dispersia lipozomială cu o concentrație a tretinoinului de 0,01% și s-a omogenizat foarte bine preparatul.

S-a preparat și un hidrogel cu tretinoin 0,01% neîncapsulat în lipozomi, respectiv, un hidrogel simplu fără substanța medicamentoasă.

În scopul obținerii concentrației de acid retinoic în lipozomi necesară realizării gelului medicamentos, dispersia de lipozomi obținută după separarea pe Sephadex s-a concentrat la evaporator rotativ, la 30°C sub presiune redusă. Din 3 ml dispersie de lipozomi s-a obținut 1 ml dispersie concentrată în decurs de 2 ore. În dispersia concentrată s-a dozat acidul retinoic. S-a verificat eficiența încorporării după concentrare, trecând dispersia de lipozomi din nou pe Sephadex și dozarea tretinoinului în eluatul cu lipozomi.

Pentru dozarea tretinoinului în gel s-au diluat 0,5 g gel cu 10 ml tampon fosfat izotonic și s-a eluat pe Sephadex, apoi s-a determinat cantitativ tretinoinul spectrofotometric în UV la 341nm. S-a făcut și o dozare în UV după dizolvarea tretinoinului din gel în metanol, urmată de filtrare.

#### Determinarea cantitativă a acidului retinoic în gel:

S-au cântărit exact 2 g gel și s-au triturat cu 8 ml metanol. Din dispersia obținută s-a măsurat exact 5 ml care s-a filtrat printr-o membrană filtrantă Millipore cu diametrul porilor 0,2 μm, folosind metoda presiunii reduse. S-a măsurat exact cantitatea rezultată și s-a completat solventul evaporat până la volumul luat în lucru. Extincția s-a citit în UV la 341 nm față de metanol. S-a calculat concentrația cu ajutorul unei curbe de etalonare întocmită în aceleași condiții. S-a calculat cantitatea de acid retinoic din hidrogel.

#### Reologia gelului de uz topic:

S-a determinat curba de curgere cu un vâscozimetru rotațional (Rheotest) la preparare și în timpul stocării la diferite perioade de timp de la preparare, la 20°C.

#### Stabilitatea gelului cu lipozomi cu acid retinoic:

S-a determinat concentrația acidului retinoic din gel după stocare la diferite perioade de timp (după 3 luni, după 6 luni, după 1 an) la temperatura camerei, prin metoda de determinare cantitativă expusă la punctul 2.2.2.

### 2.2.3. Rezultate și discuții

Eficiența încorporării acidului retinoic în lipozomi este prezentată în tabelul 2.5, randamentul încorporării acidului retinoic fiind de 32,1 %.

Tabelul nr. 2.5

*Eficiența încorporării acidului retinoic în lipozomi*

Fofatidilcolina: acid retinoic (mol · 10 <sup>2</sup> )	I.R. <sup>a</sup> (% încorporării acidului retinoic)	C.I. <sup>b</sup> ml/mmol	E.I. <sup>c</sup> (fracția molară acid retinoic / mol lipide,%)
<b>1,27 : 0,36</b>	<b>32,1</b>	<b>1,3</b>	<b>2,2</b>

a: calculată cu ec. 2.2.; b: calculată cu ec. 2.1.; c: calculată cu ec. 2.3

Condiții inițiale suplimentare: 10 ml metanol; 5 ml tampon fosfat izotonic pH = 7,4

În tabelul; nr. 2.6 se arată conținutul în acid retinoic din gel la preparare și după o perioadă de stocare la temperatura camerei.

Tabelul nr. 2.6

*Conținutul în acid retinoic al gelului cu lipozomi în g și %\**

La preparare	După 3 luni	După 6 luni	După 1 an
<b>0,0098 (98%)*</b>	<b>0,0098 (98%)*</b>	<b>0,0097 (97%)*</b>	<b>0,0094 (94%)*</b>

\* reprezintă conținutul în acid retinoic al gelului cu lipozomi în % față de cantitatea de acid retinoic utilizată la preparare

Se constată o scădere a conținutului procentual al acidului retinoic în timp, dar procentul este în limita admisă de Farmacopeea Română Ed. a X-a (pentru un conținut în substanță activă de până la 0,1%, abaterea admisă față de valoarea declarată este de ± 7,5%).

Gelurile considerate preparate semisolide, sunt corpuri ne-newtoniene și posedă o vâscozitate structurală sau sunt structural vâscoase. Corpurile ne-newtoniene, în funcție de microstructura lor pot avea o curgere plastică, pseudoplastică, dilatantă, tixotropă sau o comportare reopexă.

Corpurile plastice au nevoie de o anumită forță de forfecare denumită prag de curgere (limită de curgere) pentru a fi în stare de curgere. Curba de curgere nu pornește din origine, ci la o anumită valoare a forței de forfecare. Corpurile plastice pot fi considerate solide sub valoarea tensiunii de curgere și fluide peste această valoare.



Reprezentând gradientul de viteză ( $D$ ) în funcție de tensiunea de forfecare aplicată ( $\tau$ ) se obține curba de curgere a unui corp plastic (reograma). Punctul de curgere nu poate fi determinat experimental, și se extrapolează pe abscisă prelungind linia dreaptă a curbei de curgere a corpului plastic.

În figura 2.9 se redă reograma hidrogelului cu lipozomi cu acid retinoic.

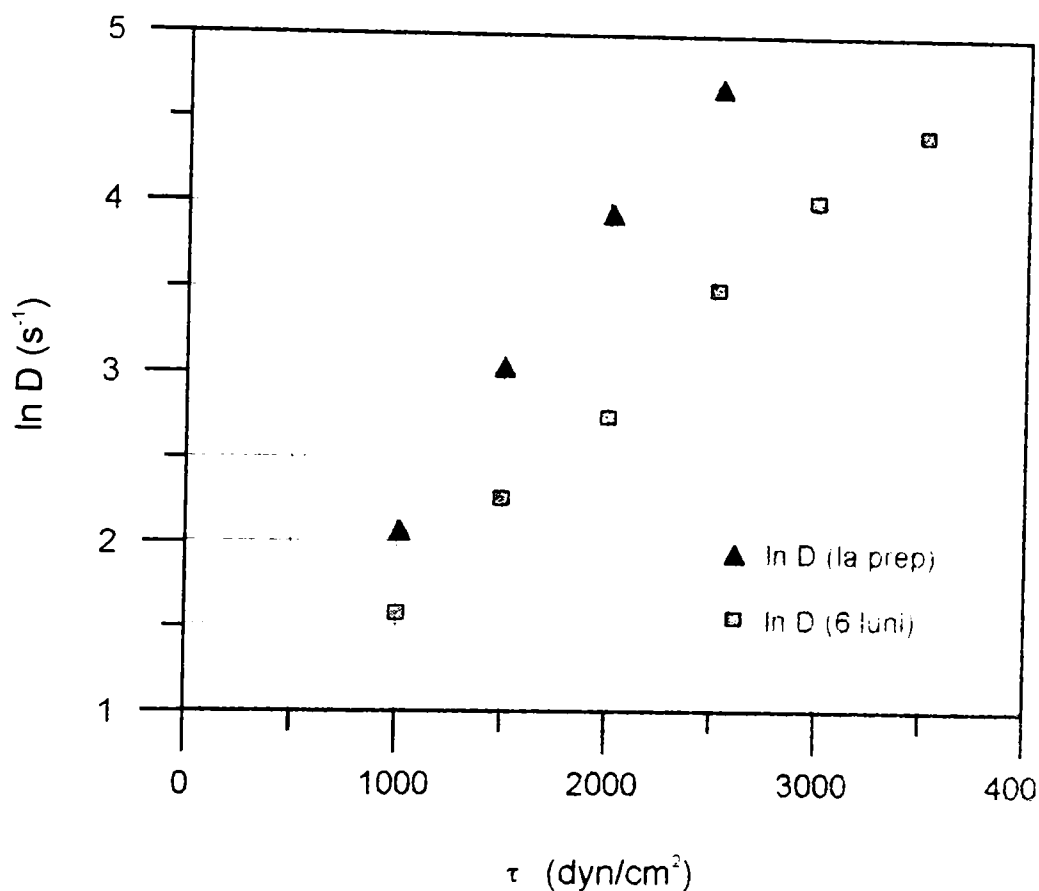


Fig. 2.9 Reograma hidrogelului cu lipozomi cu acid retinoic la diferite perioade de timp în reprezentarea semilogaritmă a porțiunilor descendente ( $\tau$  – forța de forfecare;  $D$  – deformarea sau gradientul de viteză)

Se constată că gelul are un comportament plastic având un punct de curgere la aproximativ  $250 \text{ dyn/cm}^2$  la preparare. În timpul păstrării are loc o structurare reflectată de creșterea vâscozității și deplasarea punctului de curgere la o forță de forfecare de aproximativ  $500 \text{ dyn/cm}^2$ . În ambele cazuri valoarea punctului de curgere este relativ mică, ceea ce va permite o etalare ușoară a preparatului pe tegument. Pe de altă parte, în timp, structurarea excipientului nu este însemnată, ceea ce pledează pentru păstrarea caracteristicilor reologice pe perioada de timp studiată.

#### **2.2.4 Concluzii**

Încorporarea lipozomilor cu acid retinoic într-un hidrogel a permis obținerea unui preparat dermatologic în care substanța medicamentoasă asigură o concentrație terapeutică.

Metoda de preparare a lipozomilor și a hidrogelului precum și determinarea cantitativă a acidului retinoic din lipozomi și din hidrogel este accesibilă la nivel de laborator.

Stabilitatea hidrogelului cu acid retinoic este corespunzătoare.

Caracteristicile reologice la preparare și în timp asigură ușurința aplicării preparatului în tratamentul topic. Preparatul se pretează la evaluare farmacologică și toxicologică.

### **2.3. Evaluarea acțiunii și toleranței cutanate a unor preparate lipozomice și non-lipozomice cu acid retinoic la iepuri**

#### **2.3.1. Introducere**

Importanța crescută a utilizării topice a retinoizilor în dermatologie a fost evidențiată și rezultatele obținute coroborate și sistematizate în mai 1997 la New York cu ocazia Congresului Academiei Americane de Dermatologie, consacrat acestei teme de cercetare aflată în continuă dezvoltare.

Acțiunile farmacologice ale acidului retinoic all-trans la nivelul pielii (vezi Partea generală cap. 1) au condus la obținerea unor noi preparate farmaceutice de uz topic cu toleranță crescută de tipul formulărilor în care substanța medicamentoasă este inclusă în lipozomi.

Pielea sau organul cutanat este un înveliș membranos, conjunctivo-epitelial, flexibil și protector care acoperă întreaga suprafață a corpului și se continuă cu mucoasele cavităților naturale. De la exterior spre interior organul cutanat este structurat în trei zone distincte: epidermul, dermul și hipodermul.

Epidermul este un epiteliu pluristratificat pavimentos cu evoluție fiziologică progresivă spre cornificare; celulele care îl alcătuiesc, keratinocitele au ca funcție de bază biosinteza keratinelor, cu rol de susținere și protecție. Din profunzime spre suprafața epidermului se disting mai multe zone, în continuitate, de morfologie diferită și anume: zona de joncțiune dermo-epidermică, stratul bazal, stratul spinos, stratul granulos și ultimul, stratul cornos. Etapele diferențierii vectoriale normale a keratinocitului sunt prezentate schematic în figura 2.21 (săgeata A).

*Stratul bazal*, este alcătuit dintr-un singur rând de celule, (la om, șoarece, iepure) în care predomină celulele bazale propriu-zise. Keratinocitele bazale sunt celule înalte, cilindrice, voluminoase cu nucleu alungit, numeroase organite celulare și cu o bogată activitate germinativă. De o importanță deosebită structurală și funcțională sunt legăturile intercelulare și cele cu membrana bazală realizate prin membrana celulară dar și prin *desmozomi* sau *hemidesmozomi*. Filamentele de keratină sunt prezente rar. Prin proliferarea și alunecarea spre exterior a celulelor bazale se formează și celelalte rânduri de celule epiteliale ale epidermului.

*Stratul spinos* este situat deasupra celui bazal și este alcătuit din keratinocite voluminoase, policiclice, așezate în mozaic; prezintă un nucleu mare, rotund, păstrează organitele celulare cu un număr mai redus de granule de melanină. Tonofilamentele precursori ale keratinei sunt mai groase.

*Stratul granulos* este dispus deasupra celui spinos și alcătuit din celule romboidale cu axul mare orizontal. În citoplasma acestor celule este caracteristică prezența granulelor de *keratohialină*, substanță care în cursul keratinizării va constitui matricea interfilamentoasă care cimentează tonofilamentele între ele, în fascicule compacte. Prezintă nucleu, dar organitele celulare dispar progresiv. Pe măsură ce keratinocitele se încarcă de tonofilamente și keratohialină, se pregătește apariția keratinelor mature.

*Stratul cornos* al epidermului, așezat la suprafața pielii este constituit din celule turtite, lamelare, orizontalizate, intrucându-se între ele, aceste keratinocite și-au pierdut nucleul și celelalte organite celulare. Întrucât funcțiile stratului cornos implică în mod necesar rezistența și stabilitatea, keratinocitele acestei zone au o structură proprie rolului lor. Prin studii de microscopie electronică s-a evidențiat sistemul de tonofilamente în pachete ancorate la periferie de desmozomi, dispuse aproape orizontal în toate direcțiile și imersate într-o substanță interfibrilară, o matrice densă.

Trebuie remarcat faptul că stratificarea evidențiază procesul morfologic și biochimic de transformare treptată a keratinocitelor, în migrarea lor din stratul bazal până la suprafața epidermului unde ajung ca celule cornoase, complet keratinizate.

Pielea nu este doar un simplu înveliș protector al organismului, ci un adevărat organ cu funcții multiple, unele specifice diferiților săi componenți (epiderm, derm, hipoderm), iar altele sunt funcții de ansamblu în cadrul corelațiilor dintre piele și alte organe.

Funcțiile elementare ale epidermului sunt: funcția de protecție (keratinizarea, melanogeneza), apoi funcții secretorii ale glandelor sebacee și sudoripare, funcția de barieră și semipermeabilitatea pielii (legată în primul rând de stratul cornos) și pilogeneza.

Keratogeneza este o funcție specifică prin care epidermul produce zilnic keratină, o scleroproteină specială alcătuită din 18 aminoacizi. Procesul de keratogeneza este prezent în toată grosimea epidermului ca o funcție dominantă și permanent legată de diferențierea celulelor epidermice.

Volumul și forma epidermului sunt reglate prin menținerea în echilibru a ritmului mitozelor keratinocitelor cu dinamica de diferențiere și maturare a acestora sub acțiunea unui mecanism de control.

Dermul are de asemenea un rol important în diferențierea epidermului, deoarece oferă un substrat adecvat și produce factori care influențează proliferarea celulelor bazale.

Dermul este un țesut conjunctiv situat imediat sub epiderm. Structural i se disting două zone: dermul papilar și dermul reticular sau propriu-zis care este compus în principal din *fibre elastice*, de *colagen* și de *reticulină* dispuse în rețea, ceea ce conferă rezistență și elasticitate pielii.

*Fibroblaștii* și *fibrocitele* sunt elementele celulare fundamentale predominante în derm. Principala lor funcție o constituie sinteza colagenului și eliminarea lui în spațiul extracelular, sinteza elastinei și a *glicozaminoglicanilor* dermici.

*Fibrele de colagen* reprezintă 90% din totalitatea fibrelor dermului, sunt numite și fibre albe sau flexibile, iar de menținerea structurii și funcției normale a acestor fibre depinde păstrarea aspectului tânăr al pielii.

Dintre structurile anexe ale pielii fac parte și *glandele sebacee*, glande holocrine situate în derm; fiecare folicul pilos are câte o glandă sebacee asociată (aparatură pilosebaceu). Glande sebacee se găsesc și izolate în zone lipsite de pilozitate. Aceste glande asigură secreția continuă de sebum. Hipersecreția

sebacee generează tenul gras și sindromul seboreic (predispus la dezvoltarea principalei sale complicații infecțioase: acneea).

Experimentele “in vivo” pentru evidențierea acțiunii asupra pielii a numeroși retinoizi și în special a acidului retinoic all-trans (vezi Partea generală, cap. 1) s-au realizat pe diferite modele dintre care mai importante sunt: modelul urechii de iepure<sup>31</sup> și modelul de șoarece rhino – șoareci mutanți fără păr<sup>12</sup>

Acidul retinoic all-trans sau tretinoinul se utilizează în formulări topice pentru tratamentul în acnee și în anumite forme de psoriazis. El intră în compoziția unor preparate de uz topic (creme, unguente, geluri) care pot fi utilizate dacă sunt bine tolerate individual. Deseori însă, este necesară întreruperea tratamentului cu tretinoin aplicat topic în special datorită intoleranței cutanate de tip iritație (de diferite grade), eritem, deshidratare și descuamarea stratului cornos și fotosensibilizare solară crescută.

Obiectivul acestui studiu a constat în evaluarea toleranței cutanate a hidrogelului cu tretinoin inclus în lipozomi multilamelari comparativ cu preparate non-lipozomice cu tretinoin. Toleranța cutanată a acidului retinoic a fost evaluată luând în considerare gradul de iritație al pielii prin testul de badijonare pe urechea de iepure. Studiul a mai permis și o evidențiere calitativă a principalelor acțiuni farmacologice ale tretinoinului la nivelul pielii, prin modificările histologice din biopsiile prelevate chirurgical<sup>33</sup>.

### 2.3.2. Materiale și metode

#### Materiale

- acid retinoic all-trans, pulbere (Hoffman La Roche);
- lecitina de soia - fosfatidilcolina (Epikuron 200) (Lucas Mayer GmbH);
- methocel K4 - (Colorcon) (Orpington);
- acid poliacrilic - (Carbomer 934 P) (B.F. Goodrich);
- toți ceilalți reactivi folosiți au fost de puritate analitică.

Experimentul a fost efectuat pe iepuri albi adulți, New Zealand, sănătoși, cu greutatea de 2 – 2,5 kg. Alimentația animalelor (furaj brichetat), a respectat normele prevăzute în literatura de specialitate, iar condițiile de viață au fost identice (inclusiv flux luminos identic).

## **Metode**

### Prepararea lipozomilor

S-a realizat prin metoda prezentată la pct. 2.1.2. Tretinoinul și lecitina s-au asociat în proporție de 1 : 10 (în masa g/g) corespunzătoare unui raport molar 1,27 : 0,36

### Prepararea gelului

S-au realizat 3 variante de gel: gel simplu, gel cu tretinoin 0,01%, gel cu tretinoin 0,01% inclus în lipozomi, prin metoda prezentată la pct. 2.2.2.

### Preparatele farmaceutice utilizate

Gel simplu; gel cu tretinoin 0,01%; gel cu tretinoin 0,01% inclus în lipozomi; Airol<sup>®</sup>, cremă cu tretinoin 0,05% (Hoffman La Roche).

### Protocolul studiului pe iepuri

S-au folosit 15 iepuri albi, adulți, New Zealand, sănătoși, cu greutatea de 2 – 2.5 kg. Animalele au fost împărțite în 5 loturi a câte 3 iepuri:

- Lotul I : martor;
- Lotul II : iepuri tratați cu vehicol (gel simplu);
- Lotul III : iepuri tratați cu gel cu tretinoin
- Lotul IV : iepuri tratați cu gel (tretinoin inclus în lipozomi);
- Lotul V : iepuri tratați cu Airol<sup>®</sup>, cremă.

### Testul de badijonare

La fiecare iepure s-a îndepărtat pilozitatea de pe jumătatea externă a urechii și s-a lăsat astfel timp de trei zile pentru dispariția eventualelor iritații.

Animalele au fost tratate zilnic, pe fiecare ureche, cu unul dintre preparatele topice menționate mai sus (0,5 g aplicat pe o suprafață de 9 cm<sup>2</sup>) timp de 14 zile, cu excepția lotului V, la care tratamentul a fost întrerupt după 7 zile.

Aprecierea efectelor s-a făcut după următoarea notație convențională<sup>34</sup>:

0 = *tolerat*

0,5 = *ușoară iritație* (discretă pigmentare sau ischemie, deshidratare, tegument suplu și în curs de epitelizare)

1 = *iritație prezentă* (eritem, edem, deshidratare, crustă subțire, descumamare ușoară furfuracee)

2 = *iritație marcată* (eritem, edem, crustă groasă, cicatrici)

3 = *iritație foarte intensă* (crustă groasă, escare, necroze, cicatrici).

Toleranța cutanată a fost evaluată obiectiv, luând în considerare gradul de iritație de la 0 la 3.

Suprafața testată a fost fotografiată în ziua a 7-a și a 14-a a experimentului.

S-au făcut și observații asupra amendării fenomenelor apărute. Aprecierea de amendare a fenomenelor apărute, în funcție de gradul de iritație și timp este următoarea<sup>35</sup>:

- ✓ Preparat bine tolerat = 0-1 cu amendare 1-5 zile
- ✓ Toleranță mediocră = 1-2 cu amendare 6-8 zile
- ✓ Produs netolerat = 2-3 cu amendare 8-12 zile

#### Metoda de evaluare histologică

Pentru evaluarea histologică au fost prelevate chirurgical biopsii în a 4-a și în a 8-a zi de tratament.

Biopsiile obținute de la loturile luate în studiu au fost fixate în formol și incluse la parafină. S-au efectuat câte șapte secțiuni seriate din fiecare bloc de parafină care apoi au fost supuse următoarelor metode de colorare.

#### A. Metoda tricrom Gömöri

Metodă tricromă cu valoare de diagnostic morfologic. Evidențiază specific colagenul (colorantul acid verde lumină).

Tehnica de lucru:

1. Secțiunile seriate sunt deparafinate, hidratate și apoi colorate cu hematoxilină, timp de 10 minute;
2. Secțiunile se spală apoi succesiv câte 5 minute în apă curentă și apă distilată;

3. Se colorează cu colorant bicrom (verde lumină și chromotrop R) timp de 15 minute;
4. Secțiunile se spală, se deshidratează în propanol și se montează în balsam de Canada.

#### B. Metoda PAS

Evidențiază toate substraturile care potențial conțin grupări aldehidice libere. Sunt identificate predominant glicogenul și glicoproteinele.

Tehnica de lucru:

1. Secțiunile seriate sunt supuse procesului de oxidare cu acid periodic 1% timp de 5 minute;
2. Secțiunile sunt apoi spălate cu apă distilată timp de 5 minute;
3. Secțiunile sunt tratate cu reactiv Schiff timp de 15 minute;
4. Se spală din nou cu apă timp de 5 minute și se face colorare nucleară;
5. Secțiunile sunt din nou spălate bine, apoi deshidratate, clarificate în benzen și montate.

#### C. Metoda cu albastru de toluidină (pH = 4)

Evidențiază metacromatic glicozaminoglicanii care sunt colorați în violet

Tehnica de lucru:

1. Secțiunile deparafinate și hidratate sunt tratate cu tampon fosfat (pH = 4), apoi colorate cu albastru de toluidină timp de 10 minute;
2. Se spală bine cu tampon fosfat (pH = 4) timp de 5 minute;
3. Se spală apoi secțiunile cu apă distilată timp de 5 minute;
4. Secțiunile spălate sunt deshidratate, clarificate și montate.

#### D. Metoda cu albastru alcian – safranină (pH = 0,2)

Este metoda specifică pentru identificarea mastocitelor. Granulele mastocitelor care conțin condroitin sulfat sunt colorate în albastru.

Tehnica de lucru:

1. Secțiunile sunt hidratate și colorate cu soluție albastru alcian safranină (pH = 0,2) timp de 15 minute;
2. Se spală lamele cu apă distilată timp de 5 minute;
3. Secțiunile spălate sunt deshidratate, clarificate în benzen și montate în balsam de Canada.



#### E. Metoda cu orceină

Evidențiază fibrele elastice, care se colorează în brun pe fondul palid al preparatului.

Tehnica de lucru:

1. Secțiunile sunt hidratate, apoi sunt colorate cu orceină în soluție alcoolică 70% timp de 30 de minute;
2. Se face diferențiere în alcool de 70% timp de 10 minute;
3. Secțiunile sunt deshidratate, clarificate și montate.

#### F. Metoda von Kossa

Identifică depozitele de fosfat și carbonat de calciu. Depozitele de săruri de calciu sunt colorate în negru.

Tehnica de lucru:

1. Secțiunile hidratate se tratează cu soluție de  $\text{AgNO}_3$  5% timp de 10 minute, la întuneric;
2. Se face spălare repetată cu apă distilată;
3. Se tratează cu hidrochinonă 1% timp de 1 minut;
4. Secțiunile se spală cu apă distilată apoi urmează deshidratarea, clarificarea și montarea lor.

#### G. Metoda cu hematoxină – eozină

Tehnica de lucru:

1. Secțiunile deparafinate timp de 30 de minute în benzen sunt hidratate cu alcool în concentrații descrescătoare până la apă distilată;
2. Colorarea secțiunilor cu hematoxină se face timp de 5 minute;
3. Se spală succesiv câte 5 minute în apă curentă și apă distilată;
4. Secțiunile se colorează cu eozină 1% timp de 5 minute, apoi se spală cu apă distilată timp de 5 minute;
5. Preparatele sunt deshidratate în alcool de concentrație crescândă de 70%, 80%, 90%, 96%;
6. Clarefierea se face în benzen și montarea în balsam de Canada

#### Micrometrie

Evaluarea micrometrică s-a efectuat cu micrometrul ocular Zeiss. la mărire ( $\times 1200$ ) câmpuri de  $80 \mu\text{m}$ , examinare de tip intraobservator.

Aprecierea rândurilor de celule din fiecare strat s-a evaluat cu ajutorul scalei micrometrului.

### Evaluarea toxicologică

S-au făcut observații zilnice, urmărindu-se apariția de: eritem, edem, deshidratare, crustă (subțire, groasă), escară.

Biopsiile au fost examinate histologic pentru evaluarea următoarelor tipuri de leziuni: modificări de grosime, celularitate, prezența și tipul infiltratului inflamator, modificările dermului, reacția fibroblastică și leziunile pilo-sebacee.

### **2.3.3. Rezultate și discuții**

Principalele modificări observate pe tegumentul animalelor de experiență tratate, după 7 și respectiv 14 zile, au fost următoarele și sunt ilustrate în figurile 2.10 - 2.15:

#### A. După 7 zile:

1. Lot tratat cu gel cu tretinoin: eritem, descuamare furfuracee, tegumentul cu aspect subțiat, ușor atrofic. prin transparență desenul vascular fiind mai evident în zona netratată, pilozitate cu tendință de rarefiere difuză, fond pe care se precizează zone net alopecice. (fig. 2.10)
2. Lot tratat cu gel cu tretinoin inclus în lipozomi: tegument de culoare normală (fără eritem), troficitate tegumentară bună, foliculi piloși cu relief diminuat, ușor atrofici, desenul vascular cu vasodilatație evidentă (venectazie), pilozitate păstrată. (fig. 2.12)
3. Lot tratat cu Aiol<sup>®</sup>: eritem întins, difuz, pe alocuri cu aspect neomogen (pătat), prezență de leziuni erozive și ulceratii superficiale acoperite cu cruste hematice, zone cu descuamație intensă, zonă de exematizare cu contur neregulat acoperită cu scuamo-cruste gălbui, prin îndepărtarea cărora se evidențiază o ușoară zemuire. S-au mai evidențiat papule foliculare cu aspect keratozic, atrofie cutanată în insule mici, pilozitate cu rarefiere difuză, trunchiurile venoase principale cu aspect dilatat până la turgescenț. (fig. 2.14)

4. Lot tratat cu gel simplu: tegument suplu de culoare normală fără eritem și foliculi piloși fără modificări. Desenul vascular practic identic cu cel al zonei netratate.

B. După 14 zile:

1. Lot tratat cu gel cu tretinoin: crustificare mai accentuată, scuamo–cruste înglobând fire de păr, tendință de refacere a pilozității. (fig. 2.11)
  2. Lot tratat cu gel cu tretinoin inclus în lipozomi: calibrul ușor diminuat față de aspectul anterior, în rest staționar. (fig. 2.13)
  3. Lot tratat cu Airol<sup>®</sup> (tratament întrerupt după 7 zile): se menține un eritem mai discret, apare hiperkeratoză foliculară, prezență redusă de scuamo–cruste, se menține și un grad redus de turgescență vasculară. Amendarea fenomenelor observate s-a produs după 8-9 zile. (fig. 2.15)
  4. Lot tratat cu gel simplu: aspectul tegumentului se menține staționar, fără modificări față de cel anterior.
- ✓ Preparatul gel simplu a fost bine tolerat (gradul 0);
  - ✓ Preparatul gel cu lipozomi, a fost foarte bine tolerat (gradul 0);
  - ✓ Preparatul gel cu tretinoin a fost apreciat cu toleranță mediocră (iritație de gradul I);
  - ✓ Preparatul Airol<sup>®</sup> a produs o iritație de gradul II, necesitând după 7 zile întreruperea tratamentului (produs netolerat).

Evaluarea histologică din ziua a 5-a și respectiv a 9-a a experimentului, a evidențiat diferite tipuri de leziuni în funcție de forma farmaceutică aplicată și de durata tratamentului. Secțiunile de tegument cu modificările specifice pentru acțiunea tretinoinului, colorate prin metoda tricrom Gömöri (mărire x 120) sunt prezentate în fig. 2.17 – 2.20.

Epidermul de iepure în mod normal este format din trei straturi celulare: un strat bazal, un strat spinos și un strat granulos.

#### A. După 4 zile

1. Lot tratat cu gel cu tretinoin: un strat cornos subțiat sau chiar absent și un număr crescut de straturi celulare (4) față de normal la iepure (3). Stratul cornos subțiat indică o hiperexfoliere sau chiar momentul inițial al unei ulceratii. Ușoară hiperplazie a epidermului; eritem prezent; numeroși foliculi piloși, la o mare parte dintre aceștia nu se mai observă cele două teci: internă și externă.
2. Lot tratat cu gel cu tretinoin inclus în lipozomi: zonă de cornificare extensivă, indicând o keratinizare precoce a epidermului. Numărul de straturi granuloase și spinoase mai numeroase față de martor; epiderm hiperplazic (42  $\mu$ ). Fibroblaștii și fibrocitele sunt numeroase având ca semnificație activarea colagenizării. Foliculii piloși sunt integri și numeroși.
3. Lot tratat cu Airol<sup>®</sup>: stratul cornos bine reprezentat în anumite zone, lipsește în altele, iar epidermul prezintă eroziuni multiple și o creștere a numărului de straturi celulare (6). Infiltrat limfocitar masiv și stază venoasă; unele glande sebacee sunt necrozate (fig. 2.20). Grosimea epidermului = 57,2  $\mu$  (față de martor = 16  $\mu$ ). Foliculii piloși nu prezintă modificări.
4. Lot tratat cu gel simplu: un strat cornos relativ bine reprezentat, același număr de straturi celulare ca martorul (3), lamina propria, fără infiltrat inflamator; stratul celulelor bazale intact și continuu, fără spongocite și fără necroză intraepitelială. Foliculi piloși prezenți și glande sebacee bine reprezentate și normale.
5. Lot martor: epiderm foarte subțire (16  $\mu$ ) format din 3 straturi celulare (1: 1: 1) caracteristice pentru pielea de iepure. În lamina propria nu este prezent infiltratul inflamator. Foliculii piloși și glandele sebacee sunt bine reprezentate și fără modificări (fig. 2.16)

B. După 8 zile (a 9-a zi):

1. Lot tratat cu gel cu tretinoin: creșterea ușoară a numărului de straturi celulare (4-5) se menține și segmentar apar zone de hipercornificare explicate ca deficit de exfoliere. Sunt prezente mici ulcerații epidermice, iar în lamina propria este prezent infiltrat inflamator limfoid cu densitate moderată. Epiderm hiperplazic (54  $\mu$ ), iar foliculii piloși și glandele sebacee sunt normale. (fig. 2.17)
2. Lot tratat gel cu tretinoin inclus în lipozomi: epiderm subțire cu 4 straturi celulare, iar stratul cornos cu mici eroziuni ceea ce indică o hiperexfoliere. Lamina propria nu are infiltrat inflamator, dar sunt prezente fibrocite și fascicule groase de colagen în dermul papilar (fig. 2.19). Foliculi piloși normali și glande sebacee mici, sau chiar absente; fără stază venoasă. Hiperplazia epidermului se menține la aproximativ aceeași valoare (staționar) ca și la 4 zile (44  $\mu$  față de 42  $\mu$ )
3. Lot tratat cu Airo1<sup>®</sup>: epiteliu cu multiple ulcerații, absent pe zone întinse și hipercornificare evidentă a stratului cornos, reprezentând 40% din grosimea sa (5 straturi celulare). Lamina propria cu infiltrat inflamator masiv: limfocitar, granulocitar (fig. 2.18). Degenerescență masivă a tijei foliculului pilos, iar glandele sebacee sunt mici și puține.
4. Lot tratat cu gel simplu: stratul cornos normal; epiderm cu număr normal de straturi celulare, în rest nu sunt modificări față de evaluarea histologică realizată după 4 zile.
5. Lot martor: fără modificări față de aspectul histologic din etapa A (după 4 zile).

Hiperplazia epidermului indusă de tretinoin este ilustrată în tabelele 2.7 și respectiv 2.8, menținându-se crescută și după 8 zile de tratament local.

*Tabelul 2.7*

*Hiperplazia indusă după administrarea topică a acidului retinoic-4 zile*

Lot tratat	Nr. straturi celulare (granulos, spinos bazal)	<i>Nr celule Bazale/*10<math>\mu</math></i>	<i>Grosimea totală a epidermului (<math>\mu</math>)</i>	Raport nr. straturi	
				Spinosa/bazal	Granulos/bazal
Martor	3 (1:1:1)	2	16	1:1	1:1
Gel simplu	3 (1:1:1)	2	19,5	1:1	1:1
Gel Tretinoin	4 (1:2:1)	2	27,8	2:1	1:1
Gel lipozomi cu Tretinoin	6 (2:3:1)	3	42	3:1	2:1
AIROL®	6 (2:3:1)	3,33	57,2	3:1	2:1

\*Valoarea reprezintă media a 3 citiri

*Tabelul 2.8*

*Hiperplazia indusă după administrarea topică a acidului retinoic-8 zile*

Lot tratat	Nr. straturi celulare (granulos, spinos bazal)	<i>Nr celule Bazale/*10<math>\mu</math></i>	<i>Grosimea totală a epidermului (<math>\mu</math>)</i>	Raport nr. straturi	
				Spinosa/bazal	Granulos/bazal
Martor	3 (1:1:1)	2	16	1:1	1:1
Gel simplu	3 (1:1:1)	2	18	1:1	1:1
Gel Tretinoin	4 (1:2:1)	1,66	54	2:1	1:1
Gel lipozomi cu Tretinoin	4 (1:2:1)	2,33	44	2:1	1:1
AIROL®	5 (1:3:1)	1,33	42,2	3:1	1:1

\*Valoarea reprezintă media a 3 citiri

Dintre modificările principale, evidențiate în urma aplicării locale a diferitelor formulări farmaceutice cu acid retinoic all-trans (tretinoin), se disting: hiperplazia epidermului și hiperexfoliere, prezente pentru toate loturile tratate cu acid retinoic (fig. 2.17), hiperkeratinizare accentuată și acumulare masivă de granulocite în dermul papilar (fig. 2.18); colagenizare masivă a dermului papilar și reticular, absența foliculilor piloși și a glandelor sebacee (fig. 2.19); ulceratii ale epidermului și dermului papilar și degenerarea glandelor sebacee (fig. 2.20).

I. Modificările apărute pe tegumentul urechii de iepure, după 7 și respectiv 14 zile de tratament cu tretinoin sunt ilustrate în fișurile următoare



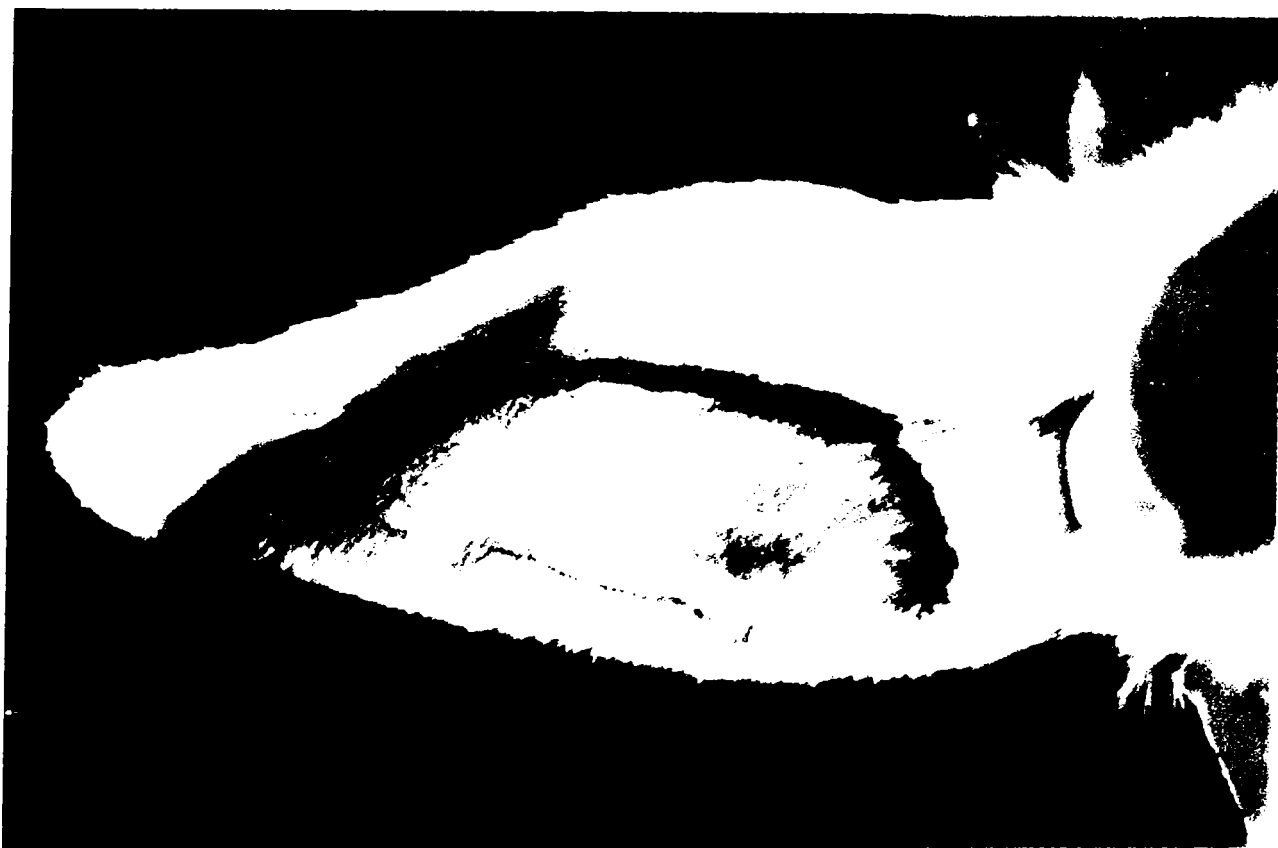
*Fig. 2.10 Tratament cu gel cu tretinoin - 7 zile.*



*Fig. 2.11 Tratament cu gel cu tretinoin - 14 zile.*



*Fig. 2.12 Tratament cu gel cu lipozomi cu tretinoin - 7 zile.*



*Fig. 2.13 Tratament cu gel cu lipozomi cu tretinoin - 14 zile.*



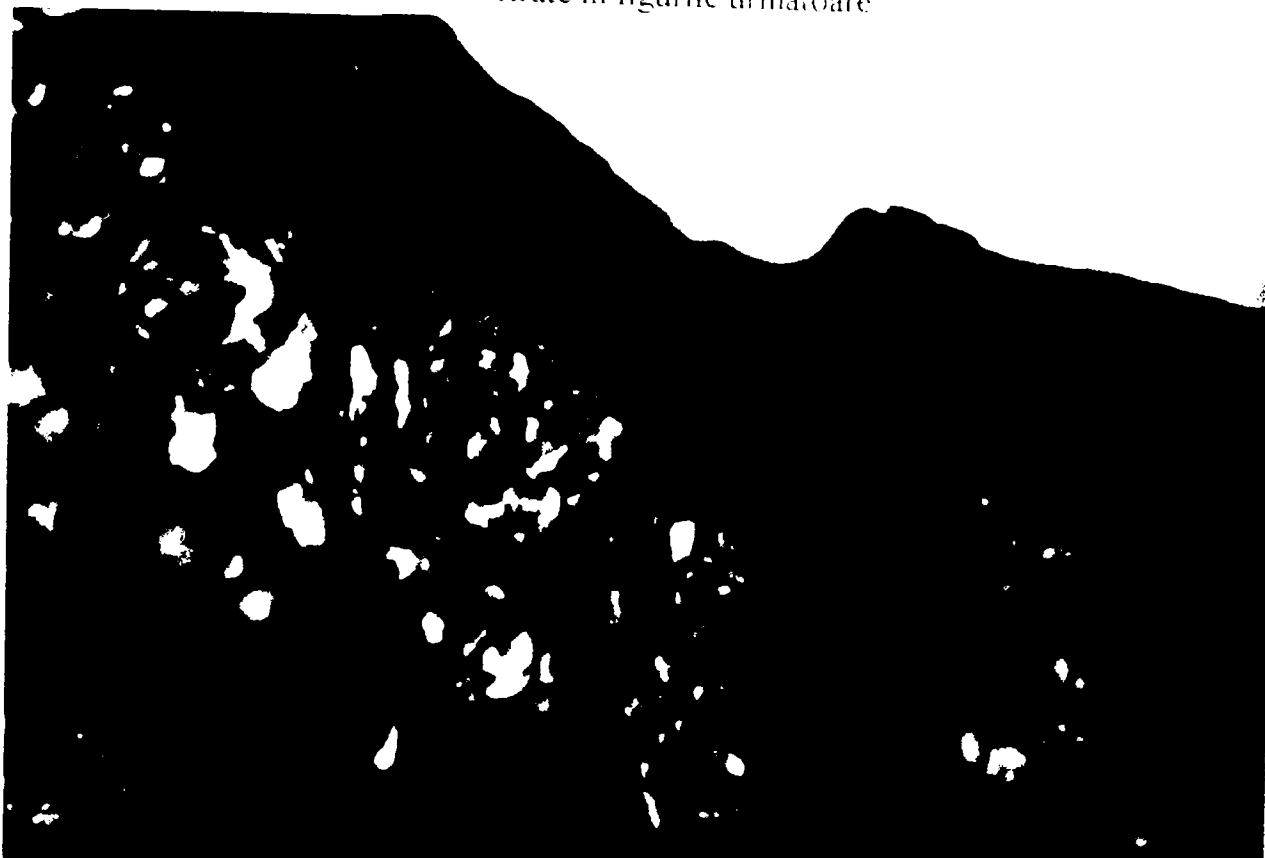


*Fig. 2.14 Tratament cu AIROL – 7 zile*



*Fig. 2.15 Tratament cu AIROL<sup>®</sup> – a 14-a zi (tratament întrerupt după 7 zile)*

II. Modificările morfologice principale evidențiate histologic în secțiunile de tegument sunt ilustrate în figurile următoare



*Fig. 2.16 Secțiune prin tegument de iepure turecher cu aspect normal (coloratie tricrom Gomori,  $\times 120$ )*



*Fig. 2.17 Secțiune prin tegument de iepure turecher: hiperplazia celulei  $\times 120$  epidermului (coloratie tricrom Gomori,  $\times 120$ )*



*Fig. 2.18 Hiperkeratinizare accentuată și acumulare masivă de granulocite în dermul papilar (colorație tricrom Gomori, × 120)*



*Fig. 2.19 Imagine de ansamblu: colagenizare masivă a dermului papilar și reticular, absența foliculilor piloși și a glandelor sebacee (tratament cu lipozomi cu Tretinoin – 8 zile) (colorație tricrom Gomori, × 120)*



*Fig. 2.20 Ulcerații ale epidermului și dermului papilar și degenerarea glandelor sebacee (tratament cu Airof® - 4 zile) (colorație micron cromiertă - 120).*

Principalele efecte evidențiate de acest studiu sunt în concordanță cu datele din literatura de specialitate referitoare la acțiunea locală a acidului retinoic și au fost următoarele:

- [1] - Deshidratarea transepidermică și eritem<sup>41</sup>
- [2] - Cornificarea și descuamarea stratului cornos<sup>42</sup>
- [3] - Modularea diferențierii celulelor epiteliale<sup>43</sup>
- [4] - Hiperplazia epidermului<sup>40,41,42</sup>
- [5] - Stimularea sintezei de colagen consecutiv proliferării fibroblaștilor dermici<sup>43,44,45,46</sup>

Numeroase studii au demonstrat că retinoizii și acidul retinoic în special, modulează proliferarea și diferențierea celulelor epiteliale<sup>47</sup>

În acest studiu după patru zile de tratament cu acid retinoic alifatic 0,01% inclus în diferite formulări topice, numărul celulelor din stratul de spinos și granulos a crescut semnificativ (trei straturi spinosase și respectiv două straturi granuloase), indicând o diferențiere compatibilă cu hiperproliferația. Numărul de celule bazale/10 μ (vezi tabelul 2.7) este și el crescut, fapt care are semnificația unei compactizări a celulelor epidermului, acțiune caracteristică tretinoinului.

Deși după patru zile de tratament nu s-au semnalat diferențe histologice ale hiperplaziei epidermului indusă de formulările cu doze diferite de acid retinoic, respectiv 0,01% și 0,05%, toleranța cutanată a preparatului lipozomic studiat a fost însă net superioară preparatului comercial AIROL<sup>®</sup> (Hoffman La Roche).

Rezultatele obținute în acest experiment, coroborate cu date din literatură<sup>36-39</sup> permit emiterea unor ipoteze asupra modului de acțiune a acidului retinoic all-trans privind diferențierea epidermului “in vivo”. În figura 2.21 este reprezentată o diagramă schematică ilustrând două ipoteze asupra modulării diferențierii epidermului prin acidul retinoic aplicat topic.

În primul rând, acidul retinoic poate influența în funcție de doză proliferarea keratinocitului și alegerea de către celulele epiteliale a unei căi de diferențiere normale (figura 2.21, săgeata A), sau a unei căi alternative (“greșite”) o cale de diferențiere compatibilă cu hiperproliferarea (săgeata B), specifică bolilor hiperproliferative în care expresia keratinelor K<sub>1</sub>/K<sub>10</sub> sau a keratinelor K<sub>6</sub>/K<sub>16</sub> este crescută<sup>47</sup> începând cu stratul spinos (figura 2.21, săgeata 1).

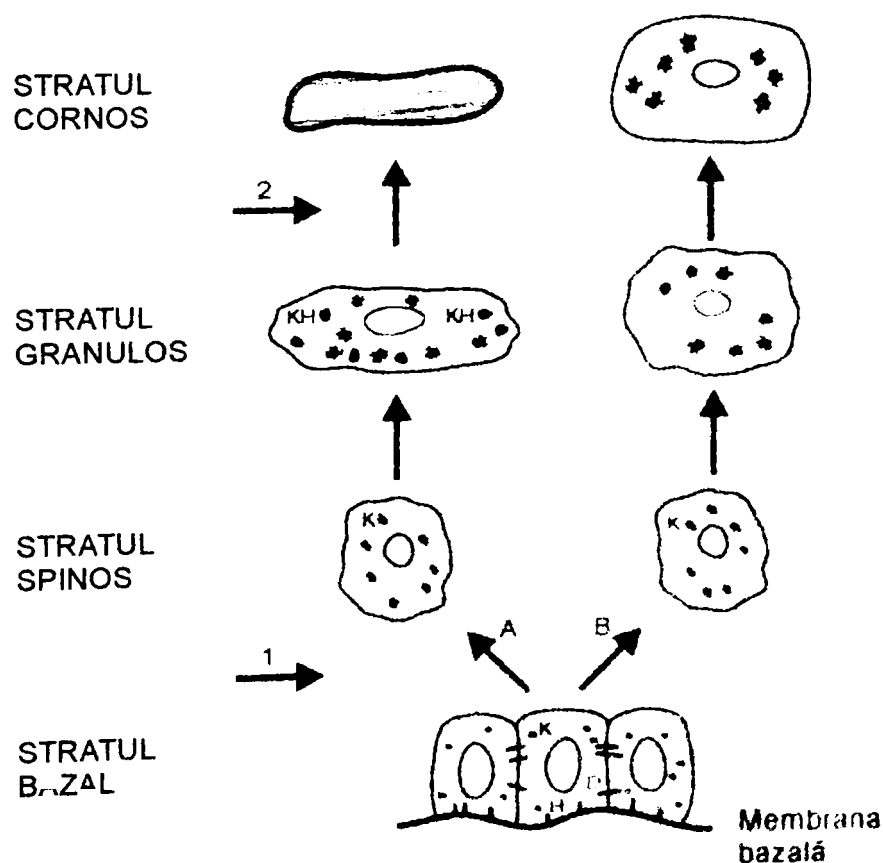


Fig. 2.21 Etapele evoluției keratinocitului și un model ipotetic asupra modulării diferențierii epidermului de acidul retinoic aplicat topic (K – filament de keratină; D – desmozom; H – hemidesmozom; KH – granulă de keratohialină; săgeata A: diferențiere normală; săgeata B: diferențiere “alterată”)

În al doilea rând, acidul retinoic ar putea influența specific un stadiu mai tardiv al diferențierii epidermului, tranziția dinspre stratul granulos spre cel cornos (figura 2.21, săgeata 2). Astfel, se poate presupune că celulele suprabazale care exprimă keratinele  $K_1$  și  $K_{10}$  (specifice stratului spinos) au evoluat pe calea diferențierii normale (A), care va conduce la formarea stratului granulos și a stratului cornos anucleat. În același timp celulele suprabazale exprimând keratinele  $K_6$  și  $K_{16}$  se măresc în volum în migrarea lor spre suprafața epidermului, dar nu mai produc granule de keratohialină (fapt observat și în acest experiment) și nici nu își mai pierd nucleul<sup>36</sup> înainte de descuamare (B). Aceste modificări pot apare numai după interacțiuni ale acidului retinoic cu celulele spinoase sau bazale. Eichner<sup>36</sup> et al. au evidențiat faptul că acidul retinoic poate diminua proteoliza keratinelor  $K_1$  și  $K_{10}$  și transformarea profilagrinei în filagrină (o componentă a granulelor de keratohialină), aceste evenimente având loc în timpul tranziției dinspre stratul granulos spre cel cornos.

Observațiile posibile în acest experiment au fost limitate, de aceea pentru completarea datelor în sprijinul ipotezelor propuse am utilizat și unele rezultate din literatură<sup>36,48</sup>.

Retinoizii sunt și inductori puternici ai hiperplaziei epidermului. În prezentul studiu a fost urmărită și cuantificată (măsurată) la anumite intervale de timp (în a 5-a și a 9-a zi de tratament) hiperplazia epidermului indusă după administrarea topică a unor formulări farmaceutice cu acid retinoic. Au fost evaluate micrometric: modificările de grosime a epidermului, de celularitate și numărul de celule bazale/10  $\mu$ . Rezultatele obținute (tabelul 2.7 și tabelul 2.8) indică o valoare semnificativ crescută a diviziunii celulare a epidermului de iepure indusă de acidul retinoic după 4 zile de tratament topic zilnic, fapt confirmat și de alte studii<sup>40,42,49</sup>, în timp ce primele semne macroscopice ale efectului topic al retinoidului sunt vizibile după mai mult de 4 zile de tratament.

Datorită structurii stratificate a epidermului o consecință a hiperplaziei acestuia este o modificare tranzitorie a proporției straturilor celulare; este semnificativ crescut numărul straturilor spinoase și granuloase comparativ cu stratul bazal, fapt confirmat și de prezentul studiu. În mod normal, epidermul la iepure are trei straturi (unul bazal, unul spinos și unul granulos); acidul retinoic prin aplicare locală a indus akantoză epidermică (îngroșarea stratului spinos). Am mai observat și o rată crescută de descuamare a corneocitelor, fapt semnalat și de Pearse<sup>50</sup> et al.

Hiperplazia epidermului indusă de acidul retinoic poate fi foarte bine corelată cu iritația locală pe care o poate produce retinoidul<sup>41</sup>. Pierderea substanțială a funcției de barieră a epidermului, sub acțiunea acidului retinoic, determină o deshidratare transepidermică, o diminuare a coeziunii și o dezorganizare a stratului cornos; diminuarea funcției de barieră a epidermului, ar putea fi o primă explicație importantă pentru două manifestări caracteristice ale iritației induse de retinoid: tegument abraziv acoperit cu mici scuamo-cruste.

Studiile de histochimie și microscopie optică au demonstrat că în condițiile acestui experiment, acidul retinoic aplicat topic stimulează proliferarea fibroblaștilor dermici și sinteza de către aceștia a colagenului, fapt confirmat și de alte cercetări<sup>43-45</sup>.

Prin metoda histochimică de colorare cu albastru de toluidină s-a evidențiat o acumulare în derm de glicozaminoglicani, un efect specific<sup>42</sup> pentru acidul retinoic după numai două zile de tratament.

Rezultatele acestui studiu au mai demonstrat o **toleranță cutanată mult mai bună a preparatului topic cu tretinoin inclus în lipozomi față de preparatele non-lipozomice.**

Scheuplein<sup>25,26</sup> a explicat cu peste 30 de ani în urmă importanța căii pilosebacee, în special în cazul absorbției cutanate a unor molecule liposolubile cu volum mare (steroizi) sau a unor substanțe puternic polare. Mai recent, în 1992, Lieb<sup>27</sup> et al. au demonstrat convingător în studiul lor că formulările lipozomice cu carboxifluoresceina sunt cele mai eficiente în comparație cu toate celelalte substanțe vehicol testate, realizând transportul acestui marker de fluorescență inclus în lipozomi, prin calea foliculară. În consecință un transport folicular țintit via un preparat lipozomic ar putea fi deosebit de avantajos, în special în tratamentul unor afecțiuni foliculare: acnee sau alopecie.

#### **2.3.4. Concluzii**

Administrarea zilnică pe tegumentul urechii de iepure, timp de 2 săptămâni a unui preparat galenic de tip gel cu tretinoin 0.01%, a condus la evidențierea unor efecte locale în concordanță cu cele din literatura de specialitate.

Preparatul galenic în care tretinoinul a fost inclus în lipozomi, cu rol de vectori medicamentoși, nu a produs iritație locală, având o toleranță mai bună

decât gelul cu tretinoin la aceeași concentrație de 0,01% substanță activă. *Sunt prezente efectele locale caracteristice tretinoinului: hiperplazia epidermului, modularea diferențierii celulelor epiteliale, acumularea de glicozaminoglicani, formarea unor fascicule groase de colagen în dermul papilar și o degenerare a glandelor sebacee.*

Preparatul Airol® a produs după 7 zile de tratament un eritem intens, leziuni erozive și ulceratii superficiale acoperite cu cruste hematice, ceea ce a impus întreruperea tratamentului.

Rezultatele acestui studiu *demonstrează o toleranță mult mai bună a preparatului topic cu tretinoin inclus în lipozomi, față de preparatele non-lipozomice*, recomandând preparatul lipozomic, atât în tratamente dermatologice, cât și în profilaxia îmbătrânirii pielii, datorată radiației solare.

## **2.4. Farmacocinetica acidului retinoic administrat sub formă de lipozomi la șobolani**

### **2.4.1. Introducere**

Acidul retinoic all-trans, metabolit format în organism din retinol și retinaldehidă, nu se absoarbe prin aport exogen decât în cantități mici și pentru absorbția sa nu necesită mecanisme specifice. Cu toate că este foarte lipofil, transportul său în circulația generală are loc mai ales prin legarea de albuminele plasmatică. Există și proteine specifice de legare pentru acidul retinoic, situate atât în membranele celulare, cât și în citozolul celular al diferitelor țesuturi, denumite CRABP I și CRABP II. Acidul retinoic se elimină rapid după metabolizarea sa în metaboliți inactivi sau activi prin bilă sau urină. Studii cu acid retinoic marcat radioactiv au indicat că bila este principala cale de eliminare a metaboliților acidului retinoic all-trans.

Pentru studii farmacocinetice pe acidul retinoic, șobolanii sunt un model farmacocinetic experimental foarte bun, în cazul administrării intravenoase a unor doze cuprinse între 0,015 mg și 5 mg/kg corp<sup>51</sup>. Alte studii de farmacocinetică a tretinoinului s-au realizat pe șoareci<sup>52</sup> și câini<sup>53</sup>.

Acidul retinoic se utilizează topic în unele afecțiuni dermatologice<sup>54</sup>, el posedă și proprietăți antiproliferative, fiind recomandat ca agent chimioterapeutic sau de chimioprevenție<sup>55, 56</sup> în anumite forme de cancer (leucemie acută



promielocitară, carcinom de prostată) administrat pe cale sistemică. Eficacitatea clinică a acidului retinoic este însă limitată de o toxicitate semnificativă, calea orală nefiind acceptabilă în tratamentul unor leziuni cutanate cronice, datorită apariției sindromului hipervitaminezei A<sup>57</sup>

O modalitate de reducere a efectelor secundare ale unor substanțe medicamentoase constă în încorporarea lor în microparticule transportoare de tipul lipozomilor. În chimioterapie este necesar un control al farmacocineticii substanțelor medicamentoase și un efort considerabil s-a îndreptat spre îmbunătățirea eficienței terapeutice prin încorporare în lipozomi<sup>58-61</sup>.

În vederea obținerii de informații referitoare la distribuția și eliminarea acidului retinoic la șobolani este necesară cunoașterea farmacocineticii dozei unice administrată pe cale intravenoasă.

În această lucrare s-a studiat farmacocinetica acidului retinoic administrat sub formă de lipozomi comparativ cu o dispersie apoasă, în care substanța medicamentoasă a fost solubilizată micelar, după administrarea unor doze unice la șobolani<sup>62</sup>.

#### 2.4.2. Materiale și metode

##### **Materiale:**

- Acid retinoic all-trans – pulbere (Hoffman La Roche);
- Lecitină de soia – fosfatidilcolina (Epikuron 200) (Lucas Mayer GmbH);
- Toți ceilalți reactivi folosiți au fost de puritate analitică.

##### **Metode:**

###### *Prepararea lipozomilor multilamelari.*

Lipozomi multilamelari (MLV) s-au obținut prin metoda lui Bangham conform capitolului 2.1. Tretinoinul și lecitina de soia s-au asociat în proporție de 1 : 10 (în greutate g/g) corespunzătoare la raportul molar 1,27 : 0,36

###### *Preparatele farmaceutice utilizate.*

S-a utilizat o dispersie apoasă de lipozomi cu acid retinoic conținând 0,2 mg acid retinoic/0,5 ml dispersie lipozomală.

S-a preparat și o dispersie apoasă de acid retinoic obținută prin dizolvarea acidului retinoic într-un amestec de apă cu propilenglicol și solubilizare micelară cu polisorbitat 80, astfel încât 0,5 ml dispersie apoasă să conțină 0,2 mg acid retinoic solubilizat micelar.

### *Protocolul studiului pe șobolani.*

S-au folosit două loturi a câte 12 șobolani albi Wistar în greutate de 200 g. Animalele nu au fost alimentate cu excepția apei, timp de 16 ore înaintea studiului. Primului lot i s-a administrat dispersia apoasă cu acidul retinoic solubilizat, iar celui de-al doilea lot i s-au administrat lipozomii cu acid retinoic. Fiecare animal a primit o doză de 2 mg acid retinoic/kg corp sub formă de lipozomi sau sub forma dispersiei cu substanța solubilizată. Administrarea i.v. s-a făcut în vena cozii. La diferite perioade de timp după administrarea dozei (15 min, 30 min, 1, 2, 3 și 4 ore) s-a recoltat sânge din vena retroorbitală, de la câte 3 animale pentru fiecare timp de prelevare. Sângele s-a recoltat cu ajutorul unor capilare de sticlă pe anticoagulant (heparina). S-a separat plasma care s-a menținut la frigider până la extracție.

### *Extracția și dozarea acidului retinoic.*

Extracția acidului retinoic s-a făcut cu cloroform efectuând două extracții succesive cu câte 2 ml cloroform pentru 1ml plasmă. S-a separat după centrifugare, stratul cloroformic și s-a evaporat la sec. Reziduul s-a reluat cu metanol și s-a determinat cantitativ acidul retinoic spectrofotometric în U.V. la 341 nm, la un spectrofotometru UV-VIS Ultrospec III (Pharmacia LKB).

### *Calculul farmacocinetic.*

Valorile experimentale ale concentrațiilor medicamentoase plasmatice în funcție de timp obținute de la câte 3 animale pentru fiecare timp de prelevare, în ambele tratamente, s-au prelucrat individual.

S-a folosit analiza compartimentală, considerând evoluția concentrațiilor în funcție de timp conformă cu cinetica de ordinul întâi, folosind un program de calculator Pharmk. Evoluția concentrațiilor în timp este conformă cu modelul farmacocinetic bicompartimentat<sup>6,3</sup> și corespunde ecuației:

$$C = A \times e^{-at} + B \times e^{-bt}$$

unde **A** și **B** sunt constante, intercepte la ordonată, iar **a** și **b** sunt constante hibride de viteză, pentru faza inițială rapidă respectiv pentru faza terminală de eliminare exponențială. S-au calculat și constantele de viteză de schimb între compartimetele,  $K_{12}$  și  $K_{21}$  precum și constanta vitezei de eliminare, de ordinul întâi,  $K_{el}$ . S-a determinat aria de sub curbă ( $ASC = A/a + B/b$ ), clearance-ul organismului ( $Cl = doză/ASC$ ) și volumul aparent de distribuție ( $Vd = Cl/b$ ).

## 2.4.3. Rezultate și discuții

### 2.4.3.1. Rezultate

În tabelul 2.9 este redată eficiența încorporării acidului retinoic în lipozomi; încorporarea relativă a fost de 27,8%.

Tabelul 2.9

*Eficiența încorporării acidului retinoic în lipozomi*

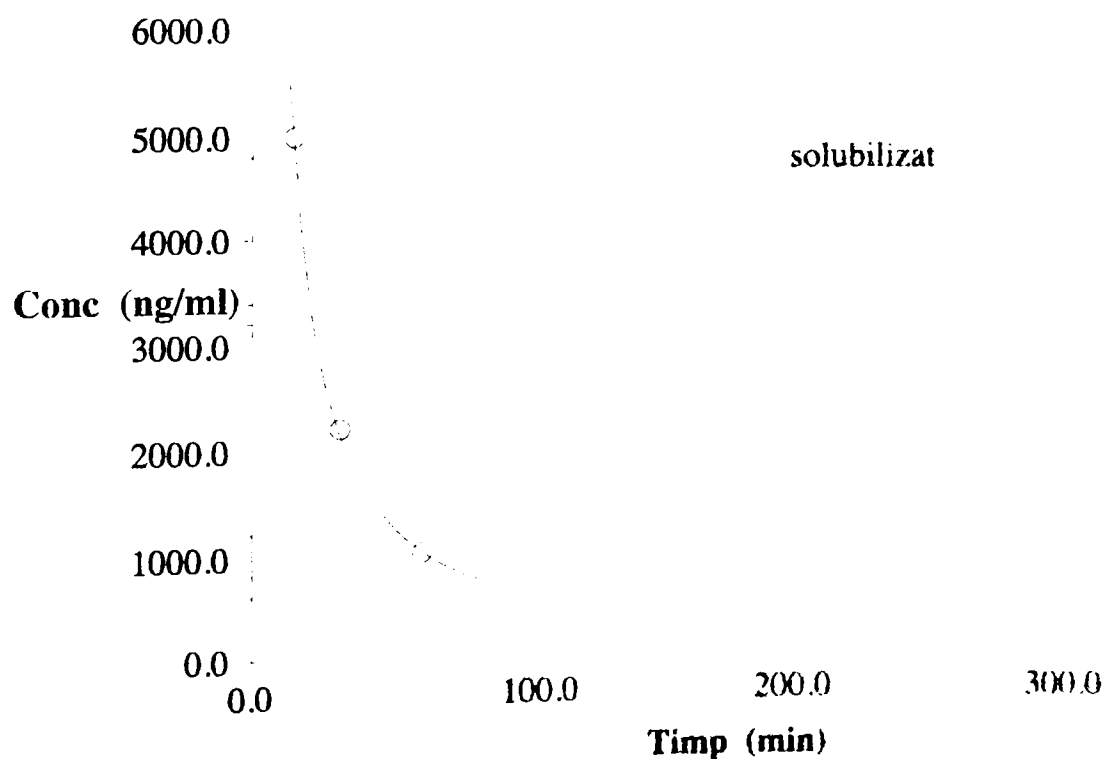
Fofatidilcolina: Acid retinoic (mol · 10 <sup>2</sup> )	I.R. <sup>a</sup> (% încorporării acidului retinoic)	C.I. <sup>b</sup> ml/mmol	E.I. <sup>c</sup> (fracția molară acid retinoic / mol lipide,%)
1,27 : 0,36	27,8	1,4	2,1

a: calculată cu ec. 2.2.; b: calculată cu ec. 2.1.; c: calculată cu ec. 2.3

Condiții inițiale suplimentare: 10 ml metanol, 5 ml tampon fosfat izotonic pH = 7,4

Cantitatea de acid retinoic încorporată este în domeniu procentelor de încorporare semnalate și în alte lucrări.

În figura 2.22 sunt reprezentate concentrațiile acidului retinoic în funcție de timp după administrarea unei doze unice intravenoase de dispersie apoasă a substanței medicamentoase solubilizate micelar.



*Fig. 2.22 Profilul concentrațiilor medicamentoase în funcție de timp după administrarea în doză unică intravenos a acidului retinoic solubilizat micelar.*

În figura 2.23 sunt reprezentate concentrațiile acidului retinoic în funcție de timp după administrarea unei doze unice de lipozomi cu acid retinoic la șobolani.

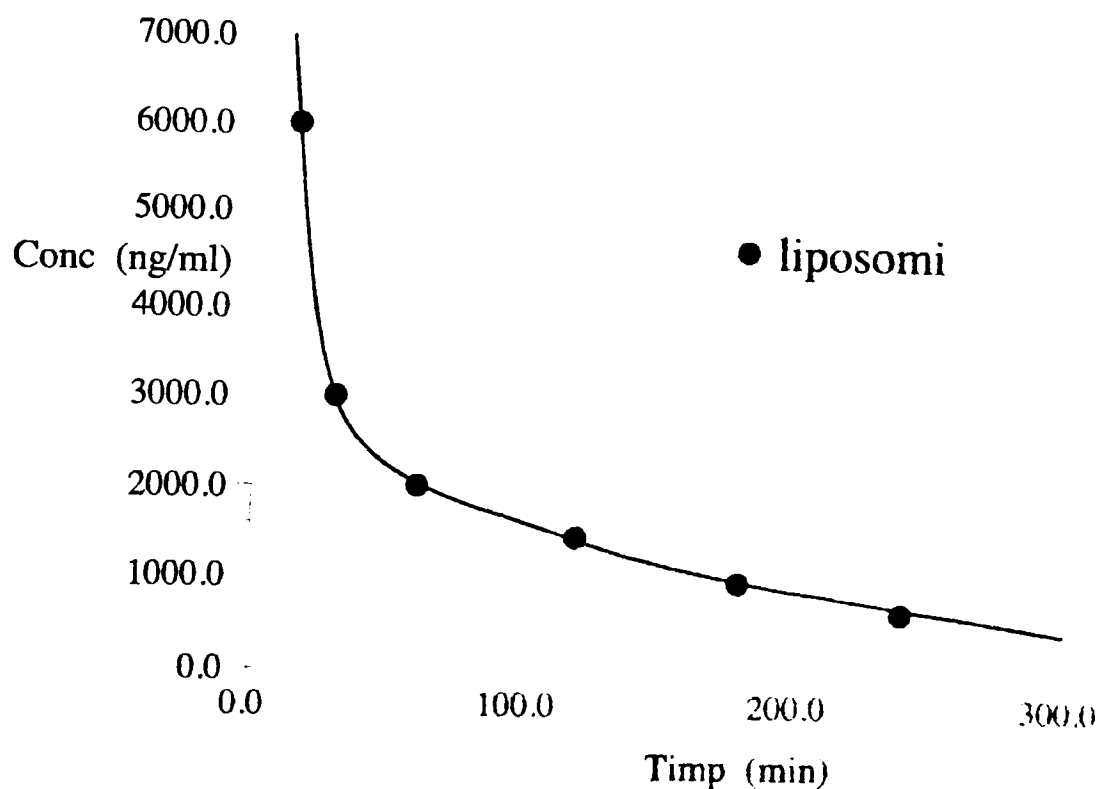


Fig. 2.23 Profilul concentrațiilor medicamentoase în funcție de timp după administrarea unei doze unice de acid retinoic sub formă de lipozomi la șobolani

Se constată că după administrarea acidului retinoic pe cale intravenoasă are loc o scădere a concentrațiilor plasmatice la început cu o viteză mai mare apoi cu o viteză mai mică. După administrarea substanței solubilizate, eliminarea practic totală are loc în aproximativ trei ore. După administrarea lipozomilor concentrațiile plasmatice se prelungesc peste patru ore.

Parametrii farmacocinetici ai acidului retinoic administrat ca soluție micelară și lipozomi în doza unică intravenoasă la șobolani sunt redați în tabelul 2.10.

*Tabloul 2.10*

*Parametrii farmacocinetici ai acidului retinoic după administrarea intravenoasă a unei doze unice de 2 mg/kg corp la șobolani, sub formă de soluție micelară și lipozomi*

<b>Parametrul Farmacocinetic</b>	<b>Soluție micelară</b>	<b>Lipozomi</b>
A <sub>1</sub> (ng)	13239	18957
A <sub>2</sub> (ng)	1677	2829
a <sub>1</sub> (min <sup>-1</sup> )	0,0876	0,1145
a <sub>2</sub> (min <sup>-1</sup> )	0,0098	0,0056
k <sub>21</sub> (min <sup>-1</sup> )	0,0186	0,0198
k <sub>12</sub> (min <sup>-1</sup> )	0,0324	0,0675
k <sub>e1</sub> (min <sup>-1</sup> )	0,0465	0,0328
t <sub>1/2</sub> (min)	14,9	21,13
Doza (μg)	400	400
V <sub>d</sub> (ml/g)	0,0268	0,0183
Cl (ml/min/g)	0,0012	0,0006
ASC (μg · ml <sup>-1</sup> · min)	320	665

Se constată că raportul constantelor de schimb între compartimente ( $k_{12}/k_{21}$ ) este supraunitar ceea ce arată o preferință a substanței medicamentoase pentru compartimentul tisular comparativ cu compartimentul central. Acest fapt este determinat de caracterul lipofil al acidului retinoic. Valoarea acestui raport este mai mare în cazul lipozomilor decât a soluției micelare, ceea ce este legat de caracterul mai lipofil al lipozomilor.

În ceea ce privește mărimea ariei de sub curba concentrațiilor plasmatică - timp (ASC) aceasta are valori duble în cazul lipozomilor față de soluție. Cantitatea de substanță medicamentoasă existentă în organism în aceeași perioadă de timp este deci mai mare în cazul lipozomilor decât a soluției. Acest fenomen este determinat de remanența prelungită a acidului retinoic în organism ca urmare a modificării farmacocineticii sale după încorporarea în lipozomi.

### 2.4.3.2. Discuții

Farmacocinetica acidului retinoic administrat sub formă de lipozomi se modifică în comparație cu farmacocinetica soluției substanței medicamentoase.

Unii cercetători au arătat că încorporarea substanței medicamentoase în lipozomi determină o modificare a distribuției în organism<sup>58</sup>. În general, lipozomii rămân în circulație o perioadă mai lungă de timp decât substanța

medicamentoasă liberă. Într-un studiu referitor la distribuția unor substanțe medicamentoase lipofile încorporate în transportori lipidici, inclusiv a acidului retinoic în lipozomi, efectuat printr-o singură trecere prin ficat într-un sistem de perfuzare in situ, s-a constatat că are loc o retenție semnificativă în ficat a lipozomilor și a unei emulsii medicamentoase, în timp ce substanța solubilizată micelar nu suferă o modificare farmacocinetică prin prezența solubilizantului<sup>64</sup>.

Constanta vitezei de eliminare este mai mică în cazul administrării lipozomilor decât după administrarea soluției, ceea ce se traduce și într-o valoare mai mare a timpului de înjumătățire biologică. Aceasta este de 21 minute la lipozomi față de 15 minute la soluție. O explicație a acestui comportament este dată de distribuția preferențială a lipozomilor față de țesuturile profunde (raportul supraunitar mai mare al constantelor de schimb între compartimente).

Fenomenul poate fi corelat și cu datele din literatură<sup>64</sup> care arată o filtrare a lipozomilor la nivel hepatic. Acest depozit determină o eliberare prelungită a substanței medicamentoase încorporată în lipozomi. În concluzie prepararea de lipozomi cu acid retinoic este posibilă la nivel de laborator, permițând realizarea unor concentrații de acid retinoic încorporat utile unui studiu farmacocinetic.

#### 2.4.4. Concluzii

Farmacocinetica acidului retinoic administrat în doză unică intravenos la șobolani este descrisă de modelul farmacocinetic bicompartimentat.

S-a constatat un raport supraunitar al constantelor de viteză de schimb între compartimente, ceea ce denotă preferință pentru compartimentul tisular. Raportul are o valoare mai mare după administrarea lipozomilor în comparație cu soluția micelară.

Biodisponibilitatea evaluată din mărimea ariei de sub curbă este mai mare în cazul administrării dispersiei lipozomale.

Timpul de înjumătățire biologică al acidului retinoic crește prin încorporarea sa în lipozomi.

Încorporarea acidului retinoic în lipozomi modifică farmacocinetica sa și determină o prelungire a clearance-ului substanței medicamentoase.

## 2.5. Bibliografie

1. Popovici A., *Farmacia*, 1, 1-21, (1980).
2. Olson F., Hunt C.A., Szok F.C., Vail W.J., Papahadjopoulos D., *Biochem. Biophys. Acta*, 557, 9-23, (1979).
3. Skoka F., Papahadjopoulos D., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 75, 4194-4198, (1978).
4. Betageri G.V., Parsons D.L., *Int. J. of Pharmaceutics*, 81, 235-241, (1992).
5. Schenk P., Richter H., Nuhn P., *Die Pharmazie*, 41(2), 104-108, (1986).
6. Poste G., *Drug Targeting in Cancer Therapy*, Plenum Press, New York, 427-474, 1985.
7. Oudard S., Thierry A., Jorgensen T.J., Rahman A., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 28, 259-265, (1991).
8. Leucuța S.E., Popovici M., Rusu A., Poruțiu D., *Farmacia*, vol. XLIV, nr. 5-6, 76-83, 1996.
9. Bangham A.D., Horne R.W., *J. Mol. Biol.*, 8, 660-668, (1964).
10. Huxley H.E., Zubay G., *J. Mol. Biol.*, 2, 10, (1960).
11. Haschmeyer R.H., Myers R.S., în Hayat M.A., *Principles and Techniques of Electron Microscopy Biological Applications*, Von Nostrand Reinhold co., New York, vol. 2, 101, 1972.
12. Hayat M.A., *Principles and Techniques of Electron Microscopy Biological Applications*, Von Nostrand Reinhold co., New York, 323, 1970.
13. Lahan A., Delattre J., Couvreur P., Rossignol P., Claperon N., Puisieux F., *STP Pharma*, 6(10), 716-722, (1990).
14. Yotsuyanagi T., Nonmura M., Ikeda K., *J. Parent. Sci. Tech.*, 53, 271-275, (1981).
15. Fiske C.H., Subbarow Y., *J. Biol. Chem.*, 66, 375-400, (1925).
16. Pop V.I., Poruțiu D., Benga G., *Stud. Cercet. Biochim.*, 22, 55-58, (1979).
17. Benita S., Poly P.A., Puisieux F., Delattre J., *J. Pharm. Sci.*, 73, 1751-1755, (1984).
18. Taniguchi K., Hayashi S., *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 1214-1222, (1987).
19. Gregoriadis G., *Liposome Technology*, vols. 103, CRC Press Boca Raton, 1984.
20. Dimitrescu A., *Terapeutica*, 1, 12 - 16, 1994.
21. Orfanos C. E., Ehlert R., Gollinck H., *Drugs*, 34, 459 - 503, 1987.
22. Goodman D.S., *N. Engl. J. Med.*, 310, 1023 - 1031, 1984.
23. Mangelsdorf D.J., Evans R. M., *Cell*, 83, 841 - 850, 1995.
24. Mezel M., *Liposomes in the topical application of drugs*, in: *Liposomes as Drug Carriers*, G. Gregoriadis (ed) John Wiley & Sons, New - York, 653 - 677, 1988.
25. Scheuplein R. J., *J. Invest. Dermatol.*, 48, 79 - 88, 1967.
26. Scheuplein R. J., Blank H.I., Brauner G.J., MacFarlane D.J., *J. Invest. Dermatol.*, 52, 63 - 70, 1969.
27. Lieb L.M., Ramachandron C., Egbaria K., Weiner N., *J. Invest. Dermatol.*, 99, 108 - 113, 1992.
28. Jacobs M., Martin G.P., Marriot C., *J. Pharm. Pharmacol.*, 40, 829 - 833, 1988.
29. Ho N. F. H., Ganesan M. G., Weiner W. D., Flynn G.L., *J. Controlled Release*, 2, 61 - 65, 1985.

30. Leucuța S.E., Popovici M., Rusu A., *Farmacia*, vol. XLV, nr 1, 71-77, 1997.
31. Kligman L.H., Mills O.H., *Arch. Derm.*, **106**, 843-850, 1972
32. Mann S.J., *Anat. Rec.*, **170**: 485-500, 1971.
33. Popovici M., Leucuța S.E., Raica M., Rusu A., "Al XI-lea Congres Național de Farmacie", Iași, 8-10 Oct. 1998, rez. publ. în vol. II, 509-510, Ed. Cantes, Iași, 1998.
34. Simionovici M., Cârstea A.L., Vlădescu C., *Cercetarea farmacologică și prospectarea medicamentelor*, Ed. Medicală, București, (1983).
35. Siegenthaler G., Saurat J.G., *Pharmac. Ther.*, Vol. **40**, Nr. 1, 45-54, 1989.
36. Eichner R., Kahn M., Capetola R.J., Gendimenico G.J., Mezick J.A., *J. Invest. Derm.*, **98**, 154-161, 1992.
37. Kautsky M.B., Fleckman P., Dale B.A., *J. Invest. Derm.*, **104**, 224-230, 1995.
38. Kömüves L.G., Hanley K., Jiang Y., Elias P.M., Williams M.L., Feingold K.R., *J. Invest. Dermatol.*, **111**, 429-433, 1998.
39. Siegenthaler G., Saurat J.G., Ponc M., *Biochem. J.*, **268**, 371-378, 1990.
40. Connor M.J., Ashton R.E., Lowe N.J., *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **237**, Nr. 1, 31-34, 1985.
41. Thacher S.M., Standeven A.M., Athamkar J., Kopper S., Castilleja O., Escobar M., Beard R.L., Chandraratna R.A.S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**, Nr. 2: 528-534, 1997;
42. Griffiths C.E.H., Finkel L.J., Tranfaglia M.G., Hamilton T.A., Voorhees J.J., *Br. J. Dermatol.*, **129**, 389-394, 1993.
43. Schwartz E., Cruickshank F.A., Mezick J.A., Kligman L.H., *J. Invest. Dermatol.*, **96**, 975-978, 1991.
44. Chen S., Kiss I., Tramposch G., *J. Invest. Dermatol.*, **98**, 248-254, 1992
45. Kim H-J., Bogdan N.J., Agostaro J.D., Gold L.I., Bryce G.F., *J. Invest. Dermatol.*, **98**, 359-363, 1992.
46. Varani J., Mitra R.S., Gibbs D., Phan S.H., Dixit V.M., Wang T., Siebert K.J., Nickoloff B.J., Voorhees J.J., *J. Invest. Dermatol.*, **94**, 717-723, 1990.
47. Moll R., Moll I., Franke W.W., *Arch. Dermatol. Res.*, **276**, 349-363, 1984
48. Blumenberg M., Connolly D.M., Freedberg I.M., *J. Invest. Dermatol.*, **98**, 425-445, 1992
49. Lützw-Holm C., De Angelis P., Clausen O.P., *Arch. Dermatol. Res.*, **284**, 418-423, 1992.
50. Pearse A.D., Marks R., Maes D., *Br. J. Dermatol.*, **111**, 708-709, 1984
51. Swanson B.N., Frolik C.A., Zaharevity D.W., Roller P.R., Sporn M.B., *Biochem Pharmacol.*, **30**, 107-117, 1981.
52. Munsell M.D., Kalin J.R., Hill D.L., *Drug. Metab. Dispos.*, **15**, 207-211, 1987
53. Patel I.H., Khoo K.C., Colburn W.A., *Drug. Metab. Dispos.*, **10**, 387-390, 1982
54. Orphanos C.E., Zouboulis C.C., Almond-Roesler B., Geilen C.C., *Drugs*, **53**, 358-388, 1997.
55. Lippman S.M., Kessler J.F., Meyeskens F.L., *Cancer Treat. Rep.*, **71**, 391-405, 493-515, 1987.
56. Voks E.E., Weichselbaum R.R., Lipman S.M., Hong W.K., *N. Engl. J. Med.*, **328**, 184-194, 1993.
57. Lucec R.W., Colburn W.A., *Clin. Pharmacokin.*, **10**, 38-62, 1985.
58. Abraham I., Goundal Kar A., Mesei M., *Biopharm. Drug. Dispos.*, **5**, 387-398, 1984
59. Juliano R.L., (ed) în *Drug Delivery Systems*, Oxford University Press, New York, 1980



60. Knight C.G., *Liposomes. From physical structure to therapeutic applications*, Elsevier, Amsterdam, 1980.
61. Tokunaga Y., Iwasa T., Fujisaki J., Sawai S., Kagayama A., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3557-3564, 1988.
62. Leucuța S.E., Popovici M., Toader S., Rusu A., Poruțiu D., "Al V-lea simpozion de biofarmacie și farmacocinetică" Cluj-Napoca. 30 mai, 1997, publ. în vol. de rez. p. 28
63. Leucuța S.E., Pop R.D., *Farmacocinetica*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca. 1981
64. Takino T., Nagahama E., et al., *Int. J. Pharm.*, **114**, 43-54, 1995.

# URMĂRIREA CINETICII FOTOTRANSFORMĂRII ACIDULUI RETINOIC ȘI ARGUMENTAREA CARACTERULUI RADICALIC AL INTERMEDIARILOR

### 3.1 Introducere

Acidul retinoic (AR) este produsul de oxidare al vitaminei A (trans-retinol) și este inclus în diferite preparate dermatologice și cosmetice. Utilizatorii au semnalat deseori faptul că unguentele cu conținut de acid retinoic determină reacții de fotosensibilitate ale pielii, fenomen care se manifestă prin iritații locale. Pentru explicarea fenomenului au fost invocate argumente fiziologice și biochimice, specia chimică incriminată fiind fie chiar acidul retinoic, fie metaboliții acestuia. Prezentul studiu încearcă să aducă argumente în favoarea ipotezei conform căreia reacția de fotosensibilizare a pielii se datorează unor specii cu caracter radicalic, cu timp de viață suficient de lung, care se formează din acidul retinoic și care sunt intermediari reactivi ai procesului de fotoizomerizare.

În vederea diminuării reacției de fotosensibilizare a pielii, firmele producătoare de preparate dermatologice și cosmetice deseori adaugă substanțe de protecție. Experiența arată că unele substanțe eficiente în acest scop sunt și captatoare de radicali (hidrochinonă, 5(6)-metil-benzotriazol etc.). Se postulează următoarea imagine a fenomenului de fotosensibilizare: acidul trans-retinoic absoarbe radiația solară (policromatică) fiind excitat la una din stările staționare de tip singlet ( $S^*$ ). Prin procese de tipul "intersystem crossing" (IC) moleculele trec într-o stare excitată triplet ( $T^*$ ), purtătoare a caracterului biradicalic. Tranziția din această stare triplet în starea fundamentală de tip singlet ( $S$ ) este teoretic interzisă; ea totuși are loc datorită faptului că în timpul vibrației moleculei regulile de selecție sunt încălcate. Probabilitatea tranziției triplet-singlet este însă redusă, motiv pentru care există premisele unui timp de viață relativ lung al stării triplet, suficient pentru a se putea manifesta ca o specie chimică reactivă. Dacă această ipoteză este corectă, atunci este de așteptat ca:

- din calcule cuantochimice, efectuate asupra moleculei de AR, să rezulte existența unei stări staționare excitate de tip singlet ( $S^*$ ), accesibil în domeniul spectral ultraviolet apropiat sau vizibil;
- modelarea cuantochimică să evidențieze cel puțin o stare staționară de tip triplet ( $T^*$ ) cu energie mai joasă decât starea excitată de tip singlet de la precizarea precedentă;
- prin iradierea soluțiilor AR cu o radiație apropiată de cea corespunzătoare tranziției electronice de la starea fundamentală la prima stare excitată singlet ( $S^*$ ), să aibă loc fototransformarea AR;
- fototransformarea AR să fie modificată prin adăugarea în sistem a captatoarelor de radicali liberi (este de așteptat fie modificarea numai a vitezei de formare a produșilor de reacție, fie modificarea atât a vitezei de formare a produșilor de reacție cât și a substanței de pornire - acidul trans retinoic).

Diferite fototransformări ale AR au fost semnalate și în literatura de specialitate. Ottolenghi<sup>1</sup> în studii efectuate asupra fototransformării acidului retinoic discută posibilitatea procesului "intersystem crossing" și formulează ipoteza conform căreia acidul trans-retinoic este fotoconvertit în alți stereozomeri printr-o stare triplet a sistemului electronic  $\pi$ . Ipoteza pare plauzibilă având în vedere faptul că în starea triplet conjugarea  $\pi$  este întreruptă, iar structura electronică permite rotația unei jumătăți a moleculei față de cealaltă jumătate, cu condiția ca starea triplet să aibă viață suficient de lungă.

Lo<sup>2</sup> et al. într-un studiu efectuat prin iradierea acidului retinoic all-trans au obținut formarea ca intermediar primar ai fototransformării acidului retinoic cantități mici, dar semnificative a stării triplet a sistemului electronic  $\pi$  a substanței cercetate.

În prezentul studiu au fost urmărite trei aspecte diferite. În prima fază a studiului a fost urmărită în timp transformarea acidului retinoic all-trans. Modificarea chimică a sistemului a fost urmărită prin analiză cantitativă HPLC. În cea de a doua fază a studiului soluția izomerului 13-cis al AR a fost iradiată în condiții identice cu cele de la prima fază. Din compararea modificărilor cromatogramelor rezultă că la iradierea izomerului all-trans produsul dominant de reacție nu este izomerul 13-cis iar la iradierea izomerului 13-cis acesta se fotodegradează în produși care nu apar în cromatogramă la lungimea de undă la care a fost acordat detectorul. În cea de a treia fază a fost urmărită cinetica fototransformării AR all-trans în prezența unor captatori de radicali liberi. În

concordanță cu cele așteptate, s-a observat faptul că în prezența captatorilor de radicali liberi viteza formării izomerilor noi se micșorează.

### 3.2 Reactivi, dispozitive, aparatură utilizate

Izomerii all-trans și 13-cis ai acidului retinoic, utilizați drept materii prime în studiile fotochimice, de puritate p.a., au fost obținuți de la firma Hoffmann La Roche. Captatorul de radicali 5(6)-metil-benzotriazol, de puritate p.a., a provenit de la firma Serva. Aceste substanțe au fost utilizate fără purificări prealabile. Dimetilsulfoxidul utilizat drept solvent, de puritate analitică, produs al firmei Loba Chemie, a fost distilat înainte de utilizare. Metanolul absolut și acidul oxalic, componente ale fazei mobile în HPLC, au fost de puritate p.a.

Iradieră soluțiilor de AR all-trans și AR 13-cis a fost realizată cu o lampă de tipul LUV a firmei Luxten Lighting. Puterea lămpii a fost de 6 W. Emisia lămpii a fost limitată la domeniul spectral 340 - 410 nm.

Cromatogramele au fost efectuate cu un ansamblu HPLC al firmei Abt Jasco. Coloana cromatografică cu faza inversă a fost de tipul NUCLEOSIL C<sub>18</sub>, 4 mm x 20 cm. Efluentul a fost monitorizat prin măsurarea absorbției optice cu un detector acordat la lungimea de undă 380 nm (lampă de deuteriu). Debitul fazei mobile a fost de 1 ml/min. Din fiecare probă s-a injectat în coloană volumul de 20 μl. Eluarea componentelor a fost realizată în regim izocratic cu următoarea compoziție: soluție apoasă 0,2 M de acid oxalic : metanol anhidru în raport 1 : 7 (v/v). Acidul oxalic din amestec are rolul de a diminua disocierea grupării carboxil a AR, pentru a elimina apariția speciilor deprotonate, fapt care ar complica cromatogramele și ar acționa în sensul lărgirii "peak"-urilor cromatografice.

### 3.3 Metoda de lucru

În prima etapă a experiențelor, AR total trans a fost iradiat în soluție de dimetilsulfoxid (DMSO) fără adaos de captator de radical liber.

Soluția în dimetilsulfoxid (DMSO) a AR all-trans, supusă fototransformării, a fost de concentrația 0,24 mg/ml. Un volum de 15 ml soluție, introdus într-un vas Petri cu diametrul de 7 cm, a fost iradiat cu o lampă cu emisie în domeniul spectral 340 - 410 nm, cu putere consumată de 6 W. Ansamblul lampă - vas Petri

a fost închis într-o cutie pentru a feri proba de radiațiile necontrolabile din mediu. Temperatura în incinta închisă a fost controlată și menținută la 25 °C. Iradierea a fost efectuată intermitent în doze de câte 5 minute, iar după fiecare perioadă de iradiere a fost prelevată câte o probă de 0,5 ml. Intervalele de alimentare a lămpii au fost asigurate de un releu electronic comandat de oscilator cu cuarț, unitate care a permis controlul intervalelor de timp cu precizia de 0,01 secunde. Din probele prelevate au fost injectate câte 20 μl în coloana cromatografică. Derularea procesului de separare cromatografică a fost realizată în regim izocratic în condițiile menționate mai sus.

În cea de a doua etapă a experienței AR 13-cis a fost supus iradierii în condiții similare. Concentrația analitică a AR 13-cis în DMSO a fost 0,24 mg/ml. Condițiile de iradiere, de prelevare a probelor și de derulare a separării cromatografice au fost identice cu cele prezentate la AR all-trans.

În etapa a treia a experimentului iradierea AR total trans și a izomerului 13-cis a fost realizată în condiții identice cu cele de la fazele anterioare, cu deosebirea că în sistem au fost adăugate cantități variate de captator de radicali (5(6)-metil-benzotriazol). Înregistrarea cromatogramelor a fost executată în condițiile prezentate mai sus.

### 3.4 Rezultate și discuții

#### (I) Fototransformarea AR all-trans

Figura 3.1 și 3.2 reprezintă câteva cromatograme suprapuse ale probelor prelevate de AR all-trans în timpul procesului de iradiere. "Peak"-ul notat cu (II) corespunde AR all-trans iar "peak"-ul (I) corespunde celui descris în literatură<sup>5</sup>. Pe baza datelor din literatura de specialitate<sup>3, 5</sup>, obținute în condiții similare de separare cromatografică cu cele din lucrarea prezentă, "peak"-ul (I) a fost atribuit izomerului 11-cis. Natura "peak"-ului (III) nu a fost stabilită, dar probabil este de asemenea un stereoizomer al AR, altul decât 13-cis și 9-cis.

"Peak"-ul mic între (I) și (II) se datorează unei impurități a materiei prime. Acest "peak" apare și în cromatogramele izomerului 13-cis și mărimea lui nu este afectată de iradiere, deci este plauzibilă presupunerea că se datorează unei substanțe diferite de izomerii AR.

În timpul iradierii înălțimea "peak"-ului (I) crește iar cea a "peak"-urilor (II) și (III) scade. Se pare că în timpul iradierii izomerul all-trans al AR este transformat (cel puțin parțial) în izomerul 11-cis. Este posibil ca acest proces să fie reversibil conducând la o stare finală de echilibru. Transformarea izomerului all-trans în izomerul 11-cis este acompaniată de procesul prin care o parte a izomerului all-trans se transformă în produsul neidentificat, materializat prin "peak"-ul (III), deci imaginea globală nu corespunde unei fotoizomerizări simple, finalizate printr-o stare de echilibru, așa cum este sugerat în lucrarea semnată de Cahnmann<sup>3</sup>. Ideea fotoizomerizării reversibile de la izomerul all-trans la izomerul 11-cis este sprijinită de observațiile lui Ferguson și Johnson<sup>1</sup>. Autorii citați au constatat că procesul invers, anume fotoizomerizarea pornind de la izomerul 11-cis și evoluând spre izomerul all-trans este posibil. Lo<sup>2</sup> et al., precum și Ferguson și Johnson<sup>4</sup> susțin ipoteza conform căreia transformarea unui izomer în altul are loc prin intermediul unei stări triplet, ipoteză susținută și în prezenta lucrare.

Tabelul 3.1 conține ariile mărginite de "peak"-urile cromatografice (exprimate în unități de măsură relative, definite la fel pentru toate cromatogramele, pentru a putea fi comparate) și logaritmul (în baza naturală) acestor arii.

Drept indicator al vitezei relative de transformare/formare a unei specii chimice, a fost adoptată panta porțiunii cvasidrepte a graficelor obținute la reprezentarea logaritmului (calculat în baza naturală) ariei mărginite de "peak"-ul corespunzător speciei chimice în cauză, în funcție de timpul de iradiere (exprimat în minute). Figurile 3.3, 3.4 și 3.5 reprezintă dependența ariilor "peak"-urilor (I), (II) și (III) respectiv de timpul de iradiere, iar figurile 3.6, 3.7 și 3.8 redau dependența logaritmului (în baza naturală) "peak"-urilor de timpul de iradiere. Se observă în figurile 3.6, 3.7 și 3.8 faptul că în perioada de început a transformărilor (deci la conversie mică) dependența reprezentată este practic liniară, fapt care este în corcordanță cu imaginea de cinetică de gradul I în raport cu substanța în cauză, cel puțin la începutul transformării.

## (II) Fototransformarea AR 13-cis

Figura 3.9 reprezintă câteva cromatograme suprapuse, înregistrate după intervale de timp crescătoare de iradiere, în condiții identice de lucru cu cele de la iradierea AR all-trans. La înregistrarea cromatogramelor au fost respectate

aceleași condiții ca la AR all-trans. Soluția dimetilsulfoxidică a AR 13-cis a avut concentrația 0,24 mg/ml (identică cu cea a AR all-trans din experiența anterioară). Iradierea soluției a fost realizată în incremente de 5 minute, perioada maximă de iradiere fiind 65 minute.

Cromatogramele prezintă trei "peak"-uri demne de atenție, notate cu (IV), (V) și (VI) în figura 3.9. "Peak"-ul (IV) corespunde evident materiei prime (AR 13-cis), iar "peak"-ul (VI) pare să corespundă - conform timpului de retenție - izomerului all-trans. "Peak"-ul (IV) prezintă tendință de scădere monotonă iar "peak"-ul (VI) crește, slab dar monoton, în timpul iradierii. "Peak"-ul (V) din cromatograma AR 13-cis corespunde ca poziție cu "peak"-ul neidentificat care apare în cromatograma AR all-trans, între "peak"-urile (I) și (II). Acest "peak", atât în cromatograma AR all-trans, cât și în cromatograma AR 13-cis, nu este afectat de iradiere, la dozele de iradiere utilizate. Este posibil ca acest "peak" să corespundă unei impurități, prezentă atât în AR all-trans, cât și în AR 13-cis, livrate de la aceeași firmă producătoare. Aceste date și interpretări referitoare la corespondența chimică a "peak"-urilor cromatografice contrazic concluziile lui Ferguson și Johnson<sup>4</sup>, conform cărora izomerul 13-cis al AR se poate fotoizomeriza ușor în AR all-trans. Cromatogramele din figura 3.9 indică această transformare dar viteza ei, în comparație cu cea a consumului izomerului 13-cis, este mică.

În concluzie, datele obținute până la această fază a investigațiilor indică fototransformarea izomerului all-trans în izomerul 11-cis (I) și într-un alt izomer neidentificat în cadrul acestei lucrări (III). Iradierea izomerului 13-cis declanșează fototransformarea acestui izomer, dar majoritatea materiei prime se transformă în produși care nu se manifestă în cromatogramă la lungimea de undă la care s-a monitorizat efluentul și numai cu o conversie mică se transformă în izomerul all-trans. Figurile 3.10 și 3.11 și tabelul 3.2 redau dependența de timpul de iradiere a ariilor mărginite și respectiv a logarimului (natural) al ariilor "peak"-ului (IV).

Tabelul 3.1

Timp iradiere (min)	Arie "peak" (I)	Arie "peak" (II)	Arie "peak" (III)	ln (arie I)	ln (arie II)	ln (arie III)
0	7506	503912	115830	8,923458	13,130157	11,659879
5	49791	418503	88312	10,815590	12,944439	11,388631
10	77440	331570	72148	11,257259	12,711594	11,186475
15	100804	318608	55469	11,520933	12,671717	10,923580
20	114187	239580	36236	11,645593	12,386643	10,497808
25	128020	221194	35174	11,759942	12,306795	10,468062
30	133997	188590	30088	11,805573	12,147331	10,311882
35	140732	172479	26263	11,854613	12,058031	10,175916
40	144515	155711	23049	11,881139	11,955757	10,045378
45	152491	147449	21707	11,934861	11,901238	9,985390
50	151601	136960	20542	11,929007	11,827444	9,930227
55	155254	131565	18584	11,952818	11,787256	9,830056
60	152354	126688	18253	11,933962	11,749483	9,812085
65	152094	122513	17307	11,932254	11,715972	9,758866

Tabelul 3.2

Timp iradiere (min)	Arie "peak" (IV)	ln (arie IV)
0	521102	13,163701
5	432207	12,976660
10	378152	12,843051
15	321572	12,680977
20	277546	12,533742
25	236778	12,374878
30	211112	12,260144
35	200336	12,207751
40	192344	12,167041
45	181786	12,110585
50	180636	12,104239
55	177439	12,086382
60	173494	12,063898
65	170742	12,047909



### (III) Fototransformarea AR all-trans în prezența 5(6)-metil benzotriazolului

În continuare au fost repetate experiențele de la faza (I) vizând fototransformarea acidului retinoic all-trans, în condiții identice de iradiere și separare cromatografică, dar în prezența 5(6)-metil-benzotriazolului, compus cu caracter captator de radicali. Măsurătorile au fost efectuate cu diferite concentrații de 5(6)-metil-benzotriazol. Rezultatele prezentate în continuare sunt cele obținute cu concentrația de 2,5 mg/ml a captatorului de radical.

Figurile 3.12 și 3.13, prezintă curbele cinetice de fototransformare a AR all-trans în prezența captatorului de radicali (dependența logaritmului în baza naturală a ariilor mărginite de "peak"-urile (I) și (II) în funcție de timp). Întrucât nu s-a putut susține nici o ipoteză privind identitatea "peak"-ului (III), în această fază a experienței acest "peak" nu a constituit obiectul studiilor și discuțiilor. Tabelul 3.3 conține valorile numerice ale ariilor și logaritmul (în baza naturală) acestora, determinate în timpul iradierii.

Se constată că în cazul de față panta de început, obținută pentru "peak"-ul (I), este mai mică, iar panta "peak"-ului (II) este mai negativă decât pantele obținute în absența captatorului de radicali. Cu alte cuvinte, izomerul all-trans se consumă mai repede, iar izomerul 11-cis se formează mai încet decât în faza (I) a experienței.

*Tabelul 3.3*

Timp iradiere (min)	Arie "peak" (I)	Arie "peak" (II)	ln (arie I)	ln (arie II)
0	7510	503784	8,923991	13,129903
5	11735	398558	9,369989	12,895608
10	16317	302722	9,699963	12,620570
15	25845	235806	10,159872	12,370765
20	37040	196771	10,519754	12,189798
25	53635	171220	10,889957	12,050705
30	68874	150050	11,140034	11,918724
35	91962	131229	11,429131	11,784699
40	114695	122956	11,650032	11,719582
45	125497	120103	11,740036	11,696105
50	134169	119884	11,806855	11,694280
55	134471	117551	11,809104	11,674628
60	134756	114663	11,811221	11,649753
65	134985	113127	11,812919	11,636266

#### (IV) Fototransformarea AR 13-cis în prezența 5(6)-metil benzotriazolului

Fototransformarea AR 13-cis a fost repetată în condițiile descrise la partea (II), cu deosebirea că acum soluția dimetilsulfoxidică a izomerului 13-cis al AR a conținut și 5(6)-metil-benzotriazol la concentrația de 2,5 mg/ml. Prin diminuarea ariei mărginite de "peak"-ul (IV) s-a urmărit fototransformarea izomerului 13-cis al AR. Valorile numerice ale ariilor mărginite de "peak"-ul nr. (IV), împreună cu logaritmul natural al acestora, sunt redată în Tabelul 3.4. Forma grafică a dependenței logaritmului ariilor de timpul de iradiere se vede în figura 3.14. Ca și în faza (II) a studiilor, drept indicator de viteză la conversii mici s-a adoptat panta porțiunii de început, cvasiliniară, a graficului.

În comparație cu fototransformarea AR 13-cis în absența captatorului de radical liber, se constată că prezența captatorului mărește viteza de consumare din sistem a acestui izomer. Din acest punct de vedere "peak"-ul nr. (IV) se comportă asemănător cu "peak"-ul nr. (II) ("peak" al AR all-trans).

Aceste constatări sprijină ipoteza conform căreia izomerii all-trans și 13-cis la iradiere suferă reacții de izomerizare și de degradare, prin intermediul unor specii moleculare în care electronii au multiplicitate de spin 3 (stare triplet).

Tabel 3.4

Timp iradiere (min)	Arie "peak" (IV)	ln (arie IV)
0	521047	13,163595
5	387314	12,866991
10	278725	12,537981
15	233286	12,360020
20	202802	12,219985
25	187025	12,138998
30	174384	12,069015
35	167042	12,026001
40	160011	11,982998
45	155751	11,956014
50	154044	11,945000
55	152510	11,934985
60	146825	11,896997
65	144343	11,879948
65	144343	11,879948

Pe baza rezultatelor obținute, transformările se pot interpreta după cum urmează (Figura 3.15).

La iradierea AR all-trans, acesta trece din starea fundamentală ( $S_2$ ) în starea excitată cu caracter singlet  $S_2^*$ . Printr-un proces "intersystem crossing" (IC), în urma unei tranziții neradiative, molecula AR all-trans trece în starea excitată triplet  $T_2^*$ . Din această stare sistemul poate reveni în starea fundamentală originală  $S_2$ . Probabilitatea acestei tranziții este mică, având în vedere faptul că tranzițiile triplet-singlet teoretic sunt interzise. Datorită vibrației scheletului molecular însă, aceste tranziții totuși sunt posibile dar cu probabilitate redusă. Probabilitatea redusă a tranziției triplet-singlet este cauza timpului de viață relativ lung al stărilor triplet în comparație cu stările singlet. Tranziția (singlet excitat) - (triplet excitat) ( $S_2^* - T_2^*$ ) este posibilă dacă energia stării triplet este mai mică decât energia stării excitate singlet. În cazul moleculelor AR se poate dovedi, prin calcule de chimie cuantică, faptul că între starea fundamentală și prima stare excitată singlet există patru stări excitate triplet, toate cu energie mai mică decât energia primei stări excitate singlet,  $S_2^*$ . Starea  $T_2^*$ , cu viața relativ lungă, se mai poate transforma în alți produși. Pe de o parte se poate fotodegrada în fragmente mai mici, nedetectabile prin HPLC în condițiile de lucru adoptate, pe de altă parte se poate transforma în alți stereoizomeri prin migrarea electronilor neîmperecheați de-a lungul catenei. Datorită vieții relativ lungi a stării triplet și faptului că în aceste stări între doi atomi de carbon legătura  $\pi$  este desfăcută, în timpul existenței stării triplet o parte a moleculei se poate roti față de cealaltă parte a moleculei, iar după revenire în starea fundamentală singlet și refacerea legăturii  $\pi$  între atomii de carbon în cauză, molecula poate să apară în forma unui alt stereoizomer. Acest proces de migrare a caracterului radicalic (MR în Figura 3.15) și modul în care molecula se poate transforma dintr-un stereoizomer în altul, este ilustrat în Figura 3.16.

Speciile prezentate cu indicele 1, 3 și 4 în Figura 3.15 se referă la alți izomeri ai AR decât cel all-trans. Figura 3.15 ilustrează modul în care, prin procesul reversibil notat cu MR, starea triplet a AR all-trans se poate transforma în starea triplet a AR 11-cis. Această stare triplet din urmă se poate apoi transforma, tot prin proces de tipul MR, în alți izomeri sau se poate dezexcita în starea fundamentală a AR 11-cis,  $S_1$ . Acest proces explică de ce se diminuează "peak"-ul AR all-trans ("peak" nr. II) și aria izomerului (sau produsului de altă natură) asociat cu "peak"-ul nr. III și de ce crește aria "peak"-ului AR 11-cis

("peak" nr. I). Prin raționament similar se poate explica consumarea AR 13-cis la iradiere, numai că în acest caz probabil domină procesul de degradare spre alți produși al AR 13-cis și nu procesul de transformare a acestuia, prin MR, în alți stereoisomeri detectabili în condițiile de lucru HPLC.

Schema de reacții din Figura 3.15 mai explică și alte constatări. La adăugare în sistem a unui captator de radicali (sau de biradicali) liberi acesta acționează asupra speciilor  $T^*$  de viață relativ lungă și accelerează transformarea lor în alți produși. În consecință, formarea stereoisomerului nou prin proces de tip MR este încetinită, deci în curba cinetică de formare a acestui produs panta drepte, potrivită la partea de început a curbei, este mai mică decât panta obținută în cazul experienței corespunzătoare dar fără captator de radical în sistem.

Mai interesant însă este problema vitezei de consum a materiei prime în prezența captatorului. Viteza de "dispariție" a materiei prime este mărită de prezența captatorului (fapt atestat de mărirea valorii absolute a pantei porțiunii de început a curbei cinetice) cu toate că din caracterul ireversibil al transformării  $S^*-T^*$  ar trebui ca asupra vitezei de "dispariție" a materiei prime prezența captatorului să nu aibă nici un efect semnificativ. Totuși, datorită procesului posibil  $T^*-S$ , starea triplet poate reveni în starea fundamentală a structurii inițiale. Dacă însă captatorul consumă starea triplet, se diminuează posibilitatea de revenire a acesteia în starea fundamentală a izomerului inițial, deci global materia primă se consumă mai repede decât în experiența fără captator.

Prezentul studiu și-a propus să clarifice câteva aspecte ale fototransformării acidului retinoic, fără pretenția de a rezolva complet toate detaliile problemei. În cercetările care urmează, se impune studiul sistemului cu metode specifice radicalilor liberi (de exemplu studii RES cu captarea stărilor triplet).

#### **(V) Studiul stărilor staționare și a tranzițiilor electronice cu metodele chimiei cuantice<sup>6-10</sup>**

Pentru a argumenta faptul că după excitarea sistemului electronic al moleculelor AR din starea fundamentală în prima stare excitată singlet, sistemul poate să coboare într-o stare staționară triplet, s-a executat modelarea sistemului electronic cu metodele chimiei cuantice. Rezultatele atestă faptul că stările triplet excitate, cu energii mai joase decât cea a primei stări singlet excitate, există și că iradierea AR cu radiația din domeniul spectral amintit poate declanșa excitarea sistemului electronic în prima stare singlet. Probabilitatea tranziției din starea fundamentală în prima stare singlet excitată este însemnată având în vedere

valoarea mare (1,4949) a tăriei de oscilator calculată pentru această tranziție. Lungimea de undă a radiației care corespunde acestei tranziții (349,7 nm) este inclusă în domeniul spectral de emisie a sursei de radiații care a fost utilizată (340 - 410 nm).

Calcululele de chimie cuantică au fost executate cu programul HyperChem versiunea 5.1. Pentru optimizarea geometriei moleculare a fost utilizată metoda AM1 iar pentru calculul avansat al energiei termenilor spectrali a fost folosită parametrizarea PM3 cu interacția configurațională incluzând 6 orbitali moleculari ocupați și 6 orbitali moleculari neocupați de electroni (deci 72 de combinații de orbitali moleculari).

În Figura 3.17 este redată numerotarea atomilor în molecula AR, folosită în calculele PM3, precum și modelul Stuart - Brigleb al geometriei optimizate a moleculei de AR all-trans.

## Acid retinoic all-trans

**Optimizare de geometrie moleculară** :MM+ ; Metodă semiempirică cu parametrizare AM1

**Tratarea geometriei optimizate ("Single point")**: RHF cu parametrizare PM3 ; Interacție configurațională: 6 orbitali ocupați / 6 orbitali neocupați; Numărul total de orbitali: 116

**Starea fundamentală**: Singlet, dipolul stării: 3,2086 D

Nr. tranziției din starea fundamentală	Energia stării (peste starea fundamentală) (cm <sup>-1</sup> )	Caracterul (multiplicitatea stării (singlet/triplet))	Lungimea de undă a tranziției din starea fundamentală (nm)	Dipolul de tranziție din starea fundamentală (D)	Tăria de oscilator al tranziției din starea fundamentală
1	14759,5	T	677,5	3,6235	0
2	20345,5	T	491,5	3,5435	0
3	21550,2	T	464,0	3,3908	0
4	27540,1	T	363,1	4,7667	0
5	28597,9	S	349,7	6,2720	1,4949
6	32784,1	T	305,0	2,1204	0
7	34648,6	S	288,6	2,2091	0
8	37126,9	S	269,3	9,0535	0,1601
9	39584,7	T	252,6	15,4476	0
10	40476,1	S	247,1	9,7146	0,0184
11	42264,3	T	236,6	12,9284	0
12	42630,4	S	234,6	6,1650	0,1161
13	43186,8	T	231,6	6,1254	0
14	43634,4	S	229,2	3,0711	0,1928
15	45752,3	T	218,6	10,1852	0
16	46075,2	T	217,0	6,6898	0
17	47224,7	S	211,8	2,3533	0,1898
18	47737,4	S	209,5	0,9334	0,0249
19	48912,7	T	204,4	10,0488	0
20	49516,4	S	202,0	11,2237	0,0033
21	49726,8	S	201,1	9,5911	0,0287
22	52537,8	S	190,3	8,1568	0,0231
23	53264,4	T	187,7	14,8034	0
24	54740,4	S	182,7	25,9633	0
25	55415,7	T	180,5	1,2873	0
26	55672,6	T	179,6	3,5258	0
27	56304,0	T	177,6	1,4052	0
28	56599,1	S	176,7	10,7657	0,0040
29	57889,5	T	172,7	13,2256	0

Nr. tranziției din starea fundamentală	Energia stării (peste starea fundamentală) ( $\text{cm}^{-1}$ )	Caracterul (multiplicitatea stării (singlet/triplet))	Lungimea de undă a tranziției din starea fundamentală (nm)	Dipolul de tranziție din starea fundamentală (D)	Tăria de oscilator al tranziției din starea fundamentală
30	58051,7	T	172,3	22,3710	0
31	58280,6	S	171,6	11,0304	0,0330
32	58420,2	S	171,2	6,6857	0,0792
33	58691,4	S	170,4	6,5426	0,0719
34	60963,2	S	164,0	7,5507	0,0546
35	62233,9	T	160,7	21,0696	0
36	62742,3	S	159,4	21,8877	0,0052
37	63941,9	T	156,4	16,0768	0
38	64212,1	T	155,7	26,3630	0
39	64511,9	S	155,0	30,6164	0,0175
40	65390,4	S	152,9	9,9881	0,0032
41	65544,0	T	152,6	2,9116	0
42	66617,6	S	150,1	16,2943	0,0310
43	69068,2	T	144,8	28,9081	0
44	69703,1	S	143,5	28,6854	0,0010
45	69877,8	T	143,1	27,3615	0
46	70190,9	S	142,5	20,1845	0,0095
47	72775,0	T	138,8	27,7750	0
48	72138,4	S	138,6	27,7097	0,0003
49	72290,0	T	138,3	11,9445	0
50	73429,8	S	136,2	11,9008	0,0517
51	73776,7	T	135,5	32,7886	0
52	74129,2	S	134,9	16,0665	0,0320
53	76850,9	T	130,1	46,7785	0
54	77059,3	S	129,8	44,9881	0,0056
55	78742,4	T	127,0	34,1333	0
56	78930,9	S	126,7	32,0758	0,0081
57	81532,0	T	122,7	50,3157	0
58	81586,4	S	122,6	50,2874	0,0003
59	83188,7	T	120,2	40,1457	0
60	83277,9	S	120,1	39,0763	0,0016
61	83721,4	T	119,4	38,8928	0
62	83749,3	S	119,4	38,1518	0
63	83921,5	T	119,2	42,0356	0
64	84405,1	S	118,5	40,8825	0,0056
65	88120,0	T	113,5	47,8137	0
66	88130,8	S	113,5	47,7712	0,0001
67	89076,0	T	112,3	43,8895	0

Nr. tranziției din starea fundamentală	Energia stării (peste starea fundamentală) ( $\text{cm}^{-1}$ )	Caracterul (multiplicitatea stării (singlet/triplet))	Lungimea de undă a tranziției din starea fundamentală (nm)	Dipolul de tranziție din starea fundamentală (D)	Tăria de oscilator al tranziției din starea fundamentală
68	89194,4	S	112,1	43,7338	0,0002
69	94212,2	T	106,1	55,0501	0
70	94238,6	S	106,1	55,0036	0,0003
71	98566,4	T	101,5	58,3733	0
72	98574,3	S	101,4	58,3704	0,0024

Primii cinci termeni spectrali ai tabelului de mai sus (un termen singlet și patru tripleți) au relevanță, în sensul că tranziția de la starea fundamentală la termenul spectral singlet nr. 5 se poate realiza ținând cont de domeniul spectral al sursei de radiație utilizată (340 - 410 nm), iar termenii spectrali tripleți (nr. 1 - 4 în tabelul de mai sus) sunt cei la care sistemul poate ajunge din starea singlet excitată și care au timp de viață suficient de lung pentru a produce izomerizări prin migrarea caracterului radicalic, pentru a se manifesta ca specie chimică reactivă și pentru a interacționa cu captatorul de radicali.

În continuare sunt redate câteva rezultate referitoare la unele proprietăți fizico-chimice ale moleculelor calculate cu metoda semiempirică PM3:

- valorile proprii ale hamiltonianului electronic al moleculei;
- popularea (Mulliken) electronică a orbitalilor atomici;
- sarcinile electrice și coordonatele atomilor din structura moleculei;
- dipolmomentul molecular calculat;
- căldura de formare calculată.

#### Valori proprii ale configurației de referință(eV)

Simetria:	1 A	2 A	3 A	4 A	5 A
Val. proprie:	-42.700233	-40.354836	-38.950119	-36.793069	-35.109828
Simetria:	6 A	7 A	8 A	9 A	10 A
Val. proprie:	-35.007923	-33.454350	-30.874580	-28.750183	-28.071740
Simetria:	11 A	12 A	13 A	14 A	15 A
Val. proprie:	-27.405619	-26.833672	-25.826687	-25.577070	-23.524359
Simetria:	16 A	17 A	18 A	19 A	20 A
Val. proprie:	-21.890081	-20.603474	-20.031599	-19.191830	-18.923512
Simetria:	21 A	22 A	23 A	24 A	25 A



Val. proprie:	-18.419205	-18.130587	-17.523733	-17.139391	-16.817369
Simetria:	26 A	27 A	28 A	29 A	30 A
Val. proprie:	-16.501331	-16.229303	-15.969714	-15.693386	-15.637711
Simetria:	31 A	32 A	33 A	34 A	35 A
Val. proprie:	-15.107944	-15.051646	-14.800354	-14.707488	-14.669396
Simetria:	36 A	37 A	38 A	39 A	40 A
Val. proprie:	-14.391141	-14.236337	-14.145999	-14.062591	-13.649864
Simetria:	41 A	42 A	43 A	44 A	45 A
Val. proprie:	-13.528795	-13.362469	-13.276421	-13.083708	-12.977326
Simetria:	46 A	47 A	48 A	49 A	50 A
Val. proprie:	-12.815595	-12.728214	-12.567224	-12.523153	-12.281087
Simetria:	51 A	52 A	53 A	54 A	55 A
Val. proprie:	-12.186708	-11.980462	-11.958013	-11.604815	-11.393124
Simetria:	56 A	57 A	58 A	59 A	60 A
Val. proprie:	-11.152656	-11.113577	-10.222741	-9.440403	-8.625801
Simetria:	61 A	62 A	63 A	64 A	65 A
Val. proprie:	-1.055638	0.098650	0.816338	1.354360	1.968323
Simetria:	66 A	67 A	68 A	69 A	70 A
Val. proprie:	2.158100	2.291020	2.778588	2.981903	3.069107
Simetria:	71 A	72 A	73 A	74 A	75 A
Val. proprie:	3.118620	3.321908	3.415364	3.424885	3.428775
Simetria:	76 A	77 A	78 A	79 A	80 A
Val. proprie:	3.572123	3.626221	3.634951	3.666307	3.719085
Simetria:	81 A	82 A	83 A	84 A	85 A
Val. proprie:	3.816310	3.938543	4.023124	4.062202	4.088054
Simetria:	86 A	87 A	88 A	89 A	90 A
Val. proprie:	4.121628	4.156194	4.225043	4.232306	4.239397
Simetria:	91 A	92 A	93 A	94 A	95 A
Val. proprie:	4.259212	4.304858	4.364410	4.406566	4.410195
Simetria:	96 A	97 A	98 A	99 A	100 A
Val. proprie:	4.427983	4.460081	4.495918	4.518587	4.578408
Simetria:	101 A	102 A	103 A	104 A	105 A
Val. proprie:	4.659442	4.709621	4.806265	4.913548	4.951412
Simetria:	106 A	107 A	108 A	109 A	110 A
Val. proprie:	5.070465	5.144995	5.158782	5.299452	5.574419
Simetria:	111 A	112 A	113 A	114 A	115 A
Val. proprie:	5.590703	5.776656	5.890822	5.946866	6.122207
Simetria:	116 A				
Val. proprie:	7.253160				

### Popularea electronică a orbitalilor atomici

AO:	1 S C	1 P <sub>x</sub> C	1 P <sub>y</sub> C	1 P <sub>z</sub> C	2 S C
	1.173558	0.922881	0.947404	0.945553	1.165254
AO:	2 P <sub>x</sub> C	2 P <sub>y</sub> C	2 P <sub>z</sub> C	3 S C	3 P <sub>x</sub> C
	0.971979	0.946053	1.016903	1.160449	0.955155

AO:	3 Py C 0.992148	3 Pz C 0.997670	4 S C 1.147716	4 Px C 0.982252	4 Py C 0.930332
AO:	4 Pz C 0.994668	5 S C 1.194614	5 Px C 0.953307	5 Py C 0.954220	5 Pz C 0.995732
AO:	6 S C 1.185022	6 Px C 0.958091	6 Py C 0.931349	6 Pz C 1.024033	7 S C 1.145278
AO:	7 Px C 0.964432	7 Py C 1.000975	7 Pz C 1.004010	8 S C 1.147688	8 Px C 1.014364
AO:	8 Py C 1.011430	8 Pz C 0.946940	9 S C 1.127594	9 Px C 0.945490	9 Py C 1.013848
AO:	9 Pz C 0.996159	10 S C 1.179056	10 Px C 0.973631	10 Py C 0.943707	10 Pz C 0.971316
AO:	11 S C 1.182573	11 Px C 1.024468	11 Py C 0.938340	11 Pz C 0.977893	12 S C 1.183964
AO:	12 Px C 0.969894	12 Py C 0.938933	12 Pz C 0.950422	13 S C 1.126343	13 Px C 1.009133
AO:	13 Py C 0.981194	13 Pz C 0.968061	14 S C 1.182411	14 Px C 1.032320	14 Py C 0.953295
AO:	14 Pz C 0.965320	15 S C 1.183600	15 Px C 0.963706	15 Py C 0.959441	15 Pz C 0.967882
AO:	16 S C 1.186922	16 Px C 1.028794	16 Py C 0.948076	16 Pz C 0.975025	17 S C 1.182026
AO:	17 Px C 0.898823	17 Py C 0.939936	17 Pz C 0.939186	18 S C 1.184731	18 Px C 1.101372
AO:	18 Py C 0.958329	18 Pz C 0.971207	19 S C 1.165732	19 Px C 0.727169	19 Py C 0.878212
AO:	19 Pz C 0.804507	20 S O 1.868971	20 Px O 1.459397	20 Py O 1.309782	20 Pz O 1.774294
AO:	21 S O 1.793943	21 Px O 1.845549	21 Py O 1.396018	21 Pz O 1.274083	22 S C 1.128564
AO:	22 Px C 1.030559	22 Py C 0.973394	22 Pz C 0.970740	23 S H 0.775873	24 S H 0.945715
AO:	25 S H 0.942548	26 S H 0.940131	27 S H 0.947571	28 S H 0.944231	29 S H 0.943225
AO:	30 S H 0.954074	31 S H 0.954958	32 S H 0.957828	33 S H 0.957203	34 S H 0.956711
AO:	35 S H 0.949440	36 S H 0.952704	37 S H 0.945635	38 S H 0.954162	39 S H 0.891109
AO:	40 S H 0.891254	41 S H 0.946539	42 S H 0.946268	43 S H 0.949412	44 S H 0.892999
AO:	45 S H 0.883456	46 S H 0.891421	47 S H 0.872837	48 S H 0.928216	49 S H 0.928253
AO:	50 S H 0.949430				

### Sarcinile electrice și coordonatele atomilor

Atom	Z	Sarcina	Coordonate (Angstrom)			Masa
			x	y	z	
1	6	0.010605	-0.37391	2.34219	0.15224	12.01100
2	6	-0.100189	-0.50884	3.85914	-0.06099	12.01100
3	6	-0.105422	0.76709	4.55869	0.36590	12.01100
4	6	-0.054969	1.91876	4.12064	-0.51891	12.01100
5	6	-0.097874	1.95634	2.64171	-0.74190	12.01100
6	6	-0.098495	0.91474	1.83384	-0.46647	12.01100
7	6	-0.114695	-1.58307	1.65337	-0.47992	12.01100
8	6	-0.120422	-0.34626	2.05438	1.65667	12.01100
9	6	-0.083091	3.24624	2.15370	-1.30121	12.01100
10	6	-0.067711	0.96221	0.38346	-0.68776	12.01100
11	6	-0.123274	1.04165	-0.16567	-1.90671	12.01100
12	6	-0.043213	1.05928	-1.60408	-2.16452	12.01100
13	6	-0.084731	0.76542	-2.53047	-1.03997	12.01100
14	6	-0.133346	1.33377	-2.03678	-3.41485	12.01100
15	6	-0.074630	1.36824	-3.43422	-3.78966	12.01100
16	6	-0.138817	1.67712	-3.83730	-5.03260	12.01100
17	6	0.040030	1.71665	-5.23930	-5.44821	12.01100
18	6	-0.215640	2.02194	-5.50725	-6.73617	12.01100
19	6	0.424380	2.10466	-6.85084	-7.32158	12.01100
20	8	-0.412444	1.93988	-7.95599	-6.82743	15.99900
21	8	-0.309593	2.41958	-6.86422	-8.64263	15.99900
22	6	-0.103256	1.42248	-6.29559	-4.44693	12.01100
23	1	0.224127	2.45513	-7.76486	-8.94936	1.00800
24	1	0.054285	-1.37418	4.24284	0.51421	1.00800
25	1	0.057452	-0.72928	4.07586	-1.12493	1.00800
26	1	0.059869	0.97886	4.30016	1.42848	1.00800
27	1	0.052429	0.64743	5.65724	0.32910	1.00800
28	1	0.055769	2.88009	4.45660	-0.08104	1.00800
29	1	0.056775	1.85011	4.61172	-1.51159	1.00800
30	1	0.045926	-1.59829	1.79005	-1.56906	1.00800
31	1	0.045042	-1.57717	0.57249	-0.28255	1.00800
32	1	0.042172	-2.52213	2.05831	-0.07967	1.00800
33	1	0.042797	-1.31975	2.26340	2.11930	1.00800
34	1	0.043289	-0.09504	1.00755	1.86915	1.00800
35	1	0.050560	0.40282	2.69398	2.15277	1.00800
36	1	0.047296	4.07142	2.36810	-0.60790	1.00800
37	1	0.054365	3.24797	1.07195	-1.49293	1.00800
38	1	0.045838	3.47049	2.65903	-2.25066	1.00800
39	1	0.108891	0.89969	-0.22858	0.22366	1.00800
40	1	0.108746	1.09842	0.48343	-2.79217	1.00800
41	1	0.053461	1.53805	-2.46061	-0.26175	1.00800
42	1	0.053732	-0.20079	-2.28975	-0.57584	1.00800
43	1	0.050588	0.72477	-3.58162	-1.37081	1.00800
44	1	0.107001	1.54489	-1.30791	-4.21018	1.00800
45	1	0.116544	1.12407	-4.17265	-3.00010	1.00800
46	1	0.108579	1.91776	-3.09443	-5.80695	1.00800
47	1	0.127163	2.23036	-4.67954	-7.43025	1.00800
48	1	0.071784	0.56463	-6.90719	-4.76072	1.00800
49	1	0.071747	2.27907	-6.97444	-4.32940	1.00800
50	1	0.050570	1.18864	-5.87921	-3.45324	1.00800

**Dipolmoment molecular (Debye) 3,209**

**Căldura de formare (kcal/mol) -70.907**

## Acid 13-cis retinoic

**Optimizare de geometrie moleculară** :MM+ ; Metodă semiempirică cu parametrizare AM1

**Tratarea geometriei optimizate ("Single point")**: RHF cu parametrizare PM3 ; Interacție configurațională: 6 orbitali ocupați / 6 orbitali neocupați; Numărul total de orbitali: 116

**Starea fundamentală**: Singlet, dipolul stării: 2,4280 D

Nr. tranziției din starea fundamentală	Energia stării (peste starea fundamentală) (cm <sup>-1</sup> )	Caracterul (multiplicitatea stării (singlet/triplet))	Lungimea de undă a tranziției din starea fundamentală (nm)	Dipolul de tranziție din starea fundamentală (D)	Tăria de oscilator al tranziției din starea fundamentală
1	15180,6	T	658,7	2,6327	0
2	20544,7	T	486,7	2,4600	0
3	21634,5	T	462,2	2,5226	0
4	27551,7	T	363,0	3,3772	0
5	28939,1	S	345,6	4,7296	1,3194
6	33050,5	T	302,6	1,8841	0
7	34930,3	S	286,3	1,8693	0,0029
8	37164,3	S	269,1	6,1307	0,3194
9	40068,9	T	249,6	12,3807	0
10	40541,9	S	246,7	7,7932	0,0529
11	42159,8	T	237,2	10,8849	0
12	42597,6	S	234,8	3,9950	0,0516
13	43720,8	S	228,7	3,2941	0,1848
14	44048,3	T	227,0	6,2856	0
15	45857,1	T	218,1	7,0692	0
16	46049,0	T	217,2	7,4370	0
17	47039,6	S	212,6	4,8794	0,2369
18	47472,2	S	210,6	6,3180	0,0048
19	48662,5	T	205,5	7,9185	0
20	49378,0	S	202,5	6,8667	0,0534
21	49666,0	S	201,3	10,8284	0,0069
22	52237,1	T	191,4	1,9817	0
23	52705,3	S	189,7	8,0300	0,0942
24	53332,4	T	187,5	2,2923	0
25	53428,0	S	187,2	6,6893	0,0312
26	53933,3	T	185,4	4,7461	0
27	54734,5	T	182,7	4,5276	0
28	54896,9	S	182,2	21,0682	0,0545
29	55894,2	T	178,9	7,7965	0

Nr. tranziției din starea fundamentală	Energia stării (peste starea fundamentală) ( $\text{cm}^{-1}$ )	Caracterul (multiplicitatea) stării (singlet/triplet)	Lungimea de undă a tranziției din starea fundamentală (nm)	Dipolul de tranziție din starea fundamentală (D)	Tăria de oscilator al tranziției din starea fundamentală
30	56417,7	S	177,2	6,4322	0,0072
31	57151,0	S	175,0	6,6547	0,0010
32	57446,4	S	174,1	4,5518	0,1425
33	58228,9	T	171,7	23,3864	0
34	60917,6	S	164,2	10,4689	0,0692
35	62311,1	T	160,5	16,0328	0
36	62881,8	S	159,0	18,0551	0,0037
37	63389,7	T	157,8	15,8326	0
38	63789,7	T	156,8	27,1961	0
39	64015,2	S	156,2	26,5815	0,0276
40	65273,6	S	153,2	8,7950	0,0090
41	65299,4	T	153,1	14,6192	0
42	65888,9	S	151,8	7,3534	0,0111
43	66391,3	T	150,6	14,4235	0
44	66809,1	S	149,7	10,5344	0,0027
45	68429,2	T	146,1	26,1977	0
46	68888,3	S	145,2	25,6149	0,0006
47	69380,9	T	144,1	25,2945	0
48	69804,1	S	143,1	17,7347	0,0263
49	71430,3	T	140,0	17,6442	0
50	72463,8	S	138,0	9,1861	0,0402
51	73814,1	T	135,5	33,8821	0
52	74016,6	S	135,1	32,3563	0,0031
53	76158,5	T	131,3	40,6158	0
54	76353,8	S	131,0	39,8152	0,0044
55	78824,1	T	126,9	37,6026	0
56	78931,3	S	126,7	36,8582	0,0004
57	79609,0	T	125,6	30,3174	0
58	79682,5	S	125,5	30,3577	0,0001
59	80738,8	T	123,9	46,1147	0
60	80759,8	S	123,8	46,0873	0,0001
61	82839,2	T	120,7	38,7234	0
62	82884,2	T	120,7	36,5346	0
63	82933,4	S	120,6	38,7792	0,0008
64	83296,1	S	120,1	35,5894	0,0065
65	85207,4	T	117,4	40,9398	0
66	85223,5	S	117,3	40,8842	0,0001
67	88060,0	T	113,6	40,2378	0

Nr. tranziției din starea fundamentală	Energia stării (peste starea fundamentală) ( $\text{cm}^{-1}$ )	Caracterul (multiplicitatea stării (singlet/triplet))	Lungimea de undă a tranziției din starea fundamentală (nm)	Dipolul de tranziție din starea fundamentală (D)	Tăria de oscilator al tranziției din starea fundamentală
68	88104,1	S	113,5	40,1536	0,0002
69	93796,1	T	106,6	49,1691	0
70	93821,4	S	106,6	49,1408	0,0005
71	97875,7	T	102,2	54,1009	0
72	97878,1	S	102,1	54,1001	0

### Valori proprii ale configurației de referință (eV)

Simetria:	1 A	2 A	3 A	4 A	5 A
Val.proprrie:	-42.622620	-40.350502	-38.857792	-36.806175	-35.034424
Simetria:	6 A	7 A	8 A	9 A	10 A
Val.proprrie:	-35.005005	-33.437111	-30.878416	-28.666622	-28.121935
Simetria:	11 A	12 A	13 A	14 A	15 A
Val.proprrie:	-27.342529	-26.733145	-25.707615	-25.486423	-23.124186
Simetria:	16 A	17 A	18 A	19 A	20 A
Val.proprrie:	-21.882099	-20.750662	-20.002369	-19.224001	-18.964367
Simetria:	21 A	22 A	23 A	24 A	25 A
Val.proprrie:	-18.231092	-18.118382	-17.833376	-17.174509	-16.584139
Simetria:	26 A	27 A	28 A	29 A	30 A
Val.proprrie:	-16.552753	-15.969707	-15.780869	-15.620210	-15.404032
Simetria:	31 A	32 A	33 A	34 A	35 A
Val.proprrie:	-15.367019	-14.948730	-14.827654	-14.663348	-14.570236
Simetria:	36 A	37 A	38 A	39 A	40 A
Val.proprrie:	-14.524073	-14.188424	-14.058751	-13.975268	-13.644731
Simetria:	41 A	42 A	43 A	44 A	45 A
Val.proprrie:	-13.504840	-13.322210	-13.240958	-13.077866	-12.992788
Simetria:	46 A	47 A	48 A	49 A	50 A
Val.proprrie:	-12.756048	-12.670282	-12.502420	-12.447615	-12.279382
Simetria:	51 A	52 A	53 A	54 A	55 A
Val.proprrie:	-12.041461	-11.980830	-11.879978	-11.535625	-11.320197
Simetria:	56 A	57 A	58 A	59 A	60 A
Val.proprrie:	-11.104668	-10.980393	-10.187921	-9.357377	-8.555406
Simetria:	61 A	62 A	63 A	64 A	65 A
Val.proprrie:	-0.918311	0.148952	0.883941	1.402917	1.981090

Simetria:	66 A	67 A	68 A	69 A	70 A
Val.proprrie:	2.159870	2.317913	2.779938	3.026276	3.164118
Simetria:	71 A	72 A	73 A	74 A	75 A
Val.proprrie:	3.226163	3.427836	3.481759	3.486813	3.503047
Simetria:	76 A	77 A	78 A	79 A	80 A
Val.proprrie:	3.693720	3.704596	3.742358	3.776040	3.792081
Simetria:	81 A	82 A	83 A	84 A	85 A
Val.proprrie:	3.886418	3.920768	3.937413	4.023081	4.082703
Simetria:	86 A	87 A	88 A	89 A	90 A
Val.proprrie:	4.136103	4.150239	4.208695	4.228443	4.244301
Simetria:	91 A	92 A	93 A	94 A	95 A
Val.proprrie:	4.314826	4.335196	4.386638	4.439723	4.498357
Simetria:	96 A	97 A	98 A	99 A	100 A
Val.proprrie:	4.507217	4.521517	4.537298	4.571730	4.695169
Simetria:	101 A	102 A	103 A	104 A	105 A
Val.proprrie:	4.726874	4.794201	4.872235	4.982528	5.010094
Simetria:	106 A	107 A	108 A	109 A	110 A
Val.proprrie:	5.135351	5.200526	5.222009	5.368015	5.581917
Simetria:	111 A	112 A	113 A	114 A	115 A
Val.proprrie:	5.692251	5.852855	6.006238	6.055131	6.219212
Simetria:	116 A				
Val.proprrie:	7.241724				

### Popularea electronică a orbitalilor atomici

AO:	1 S C 1.173471	1 Px C 0.943811	1 Py C 0.952123	1 Pz C 0.919824	2 S C 1.165276
AO:	2 Px C 0.972048	2 Py C 0.954017	2 Pz C 1.008750	3 S C 1.160463	3 Px C 0.980008
AO:	3 Py C 1.001296	3 Pz C 0.963495	4 S C 1.147687	4 Px C 1.007085	4 Py C 0.951866
AO:	4 Pz C 0.948299	5 S C 1.194604	5 Px C 0.981452	5 Py C 0.953584	5 Pz C 0.968723
AO:	6 S C 1.184813	6 Px C 1.006554	6 Py C 0.944016	6 Pz C 0.962399	7 S C 1.145273
AO:	7 Px C 0.954784	7 Py C 1.003289	7 Pz C 1.011205	8 S C 1.147693	8 Px C 0.997496
AO:	8 Py C 0.994410	8 Pz C 0.980693	9 S C 1.127604	9 Px C 0.988137	9 Py C 1.020565
AO:	9 Pz C 0.947220	10 S C 1.178823	10 Px C 0.978129	10 Py C 0.967921	10 Pz C 0.948252
AO:	11 S C 1.182288	11 Px C 1.007297	11 Py C 0.966314	11 Pz C 0.962289	12 S C 1.183989

AO:	12 Px C 0.976656	12 Py C 0.944556	12 Pz C 0.947820	13 S C 1.126086	13 Px C 1.008854
AO:	13 Py C 0.946328	13 Pz C 1.000853	14 S C 1.182296	14 Px C 1.019076	14 Py C 0.978068
AO:	14 Pz C 0.944573	15 S C 1.183335	15 Px C 0.971254	15 Py C 0.981498	15 Pz C 0.944843
AO:	16 S C 1.185712	16 Px C 1.015954	16 Py C 0.984047	16 Pz C 0.947353	17 S C 1.181967
AO:	17 Px C 0.905113	17 Py C 0.944990	17 Pz C 0.934772	18 S C 1.182725	18 Px C 1.096219
AO:	18 Py C 0.981622	18 Pz C 0.949084	19 S C 1.165628	19 Px C 0.738049	19 Py C 0.855035
AO:	19 Pz C 0.813809	20 S O 1.868539	20 Px O 1.414897	20 Py O 1.274068	20 Pz O 1.851946
AO:	21 S O 1.794225	21 Px O 1.827266	21 Py O 1.476021	21 Pz O 1.214010	22 S C 1.132121
AO:	22 Px C 1.013313	22 Py C 0.946329	22 Pz C 1.008197	23 S H 0.775535	24 S H 0.946387
AO:	25 S H 0.942518	26 S H 0.940505	27 S H 0.948098	28 S H 0.944477	29 S H 0.943194
AO:	30 S H 0.953955	31 S H 0.954964	32 S H 0.958633	33 S H 0.957918	34 S H 0.956718
AO:	35 S H 0.949612	36 S H 0.953107	37 S H 0.944322	38 S H 0.953673	39 S H 0.891668
AO:	40 S H 0.890732	41 S H 0.947546	42 S H 0.948017	43 S H 0.951595	44 S H 0.889344
AO:	45 S H 0.889408	46 S H 0.865051	47 S H 0.874195	48 S H 0.940632	49 S H 0.946713
AO:	50 S H 0.943042				

### Sarcinile electrice și coordonatele atomilor

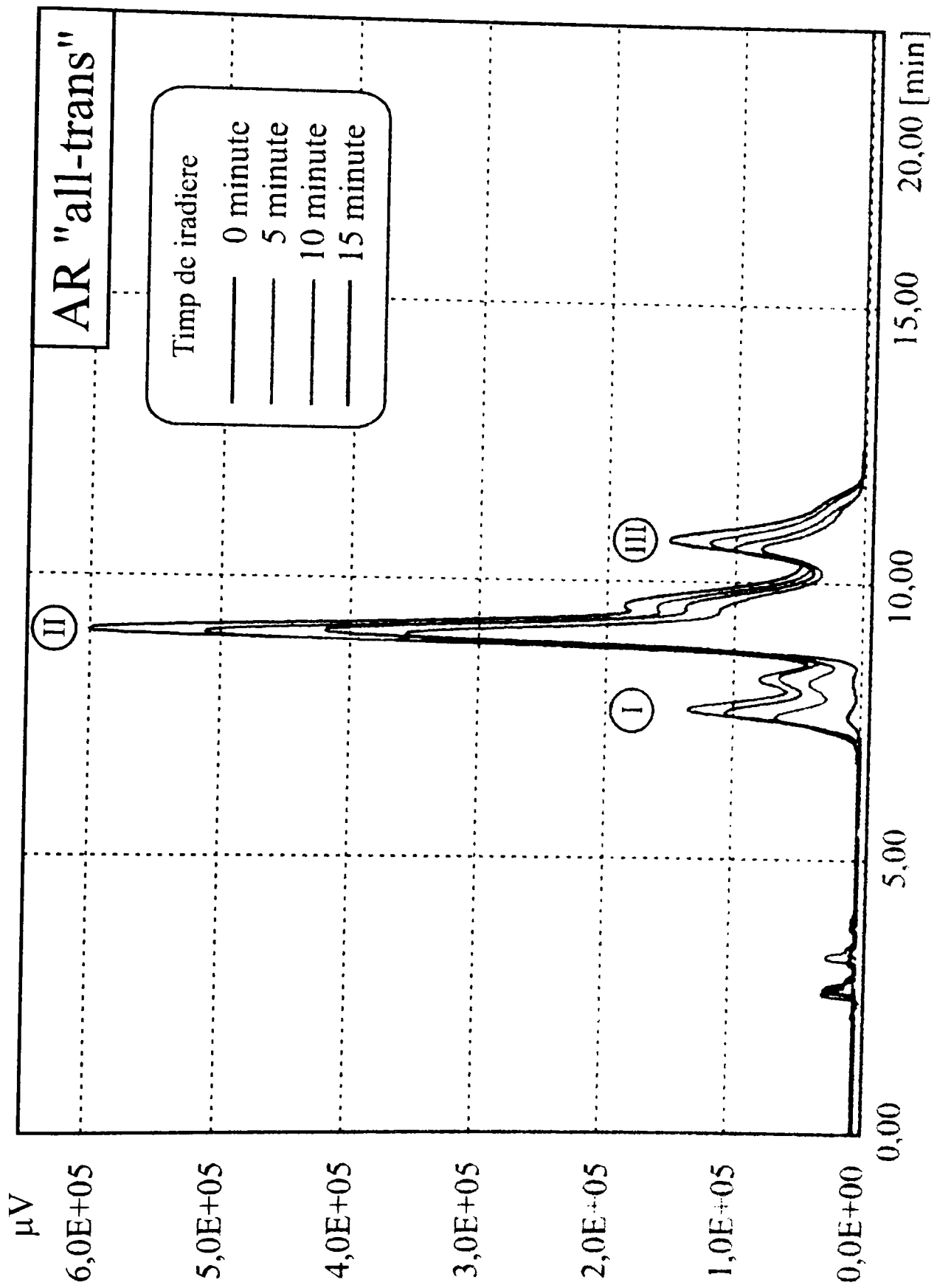
Atom	Z	Sarcina	Coordonate (Angstrom)			Masa
			x	y	z	
1	6	0.010772	0.36862	-9.81695	2.99938	12.01100
2	6	-0.100091	0.53709	-11.24931	3.53330	12.01100
3	6	-0.105262	-0.78553	-11.98815	3.46351	12.01100
4	6	-0.054937	-1.22032	-12.13674	2.01777	12.01100
5	6	-0.098363	-1.06373	-10.87685	1.22642	12.01100
6	6	-0.097782	-0.32523	-9.83378	1.65053	12.01100
7	6	-0.114551	1.75076	-9.17447	2.88531	12.01100
8	6	-0.120292	-0.48952	-9.01889	3.98613	12.01100
9	6	-0.083526	-1.79287	-10.89025	-0.07080	12.01100
10	6	-0.073127	-0.17975	-8.60198	0.86530	12.01100



11	6	-0.118187	0.47526	-8.55596	-0.30173	12.01100
12	6	-0.053021	0.65698	-7.34305	-1.09655	12.01100
13	6	-0.082122	0.37188	-6.03044	-0.46013	12.01100
14	6	-0.124014	1.08217	-7.45977	-2.37337	12.01100
15	6	-0.080930	1.29844	-6.32952	-3.25106	12.01100
16	6	-0.133065	1.66704	-6.47537	-4.53397	12.01100
17	6	0.033159	1.86723	-5.33585	-5.42288	12.01100
18	6	-0.209650	1.74869	-5.39647	-6.76384	12.01100
19	6	0.427479	1.39912	-6.58590	-7.55190	12.01100
20	8	-0.409450	0.97306	-7.68252	-7.22469	15.99900
21	8	-0.311522	1.57323	-6.42931	-8.89024	15.99900
22	6	-0.099959	2.24291	-4.03909	-4.78899	12.01100
23	1	0.224465	1.32297	-7.23206	-9.33681	1.00800
24	1	0.053613	0.91147	-11.21917	4.57538	1.00800
25	1	0.057482	1.30905	-11.78565	2.94685	1.00800
26	1	0.059495	-1.54781	-11.41293	4.03692	1.00800
27	1	0.051902	-0.71122	-12.97897	3.94852	1.00800
28	1	0.055523	-2.27451	-12.47643	1.97320	1.00800
29	1	0.056806	-0.62575	-12.92822	1.51650	1.00800
30	1	0.046045	2.37206	-9.68999	2.14147	1.00800
31	1	0.045036	1.67886	-8.12072	2.58228	1.00800
32	1	0.041367	2.28265	-9.20799	3.84546	1.00800
33	1	0.042082	0.04420	-8.84923	4.93051	1.00800
34	1	0.043282	-0.77229	-8.03822	3.58317	1.00800
35	1	0.050388	-1.41405	-9.57257	4.22053	1.00800
36	1	0.046893	-2.87547	-10.97195	0.09880	1.00800
37	1	0.055678	-1.61866	-9.98538	-0.66905	1.00800
38	1	0.046327	-1.48567	-11.75290	-0.67781	1.00800
39	1	0.108332	-0.62819	-7.70537	1.31683	1.00800
40	1	0.109268	0.91103	-9.47501	-0.71887	1.00800
41	1	0.052454	-0.69899	-5.92746	-0.23598	1.00800
42	1	0.051983	0.92351	-5.92373	0.48381	1.00800
43	1	0.048405	0.65457	-5.18709	-1.11187	1.00800
44	1	0.110656	1.27710	-8.45538	-2.79693	1.00800
45	1	0.110592	1.14697	-5.31905	-2.82128	1.00800
46	1	0.134949	1.80832	-7.47669	-4.96549	1.00800
47	1	0.125805	1.92742	-4.48624	-7.35581	1.00800
48	1	0.059368	3.32824	-4.00143	-4.62266	1.00800
49	1	0.053287	1.96934	-3.17112	-5.40277	1.00800
50	1	0.056958	1.75462	-3.92483	-3.80585	1.00800

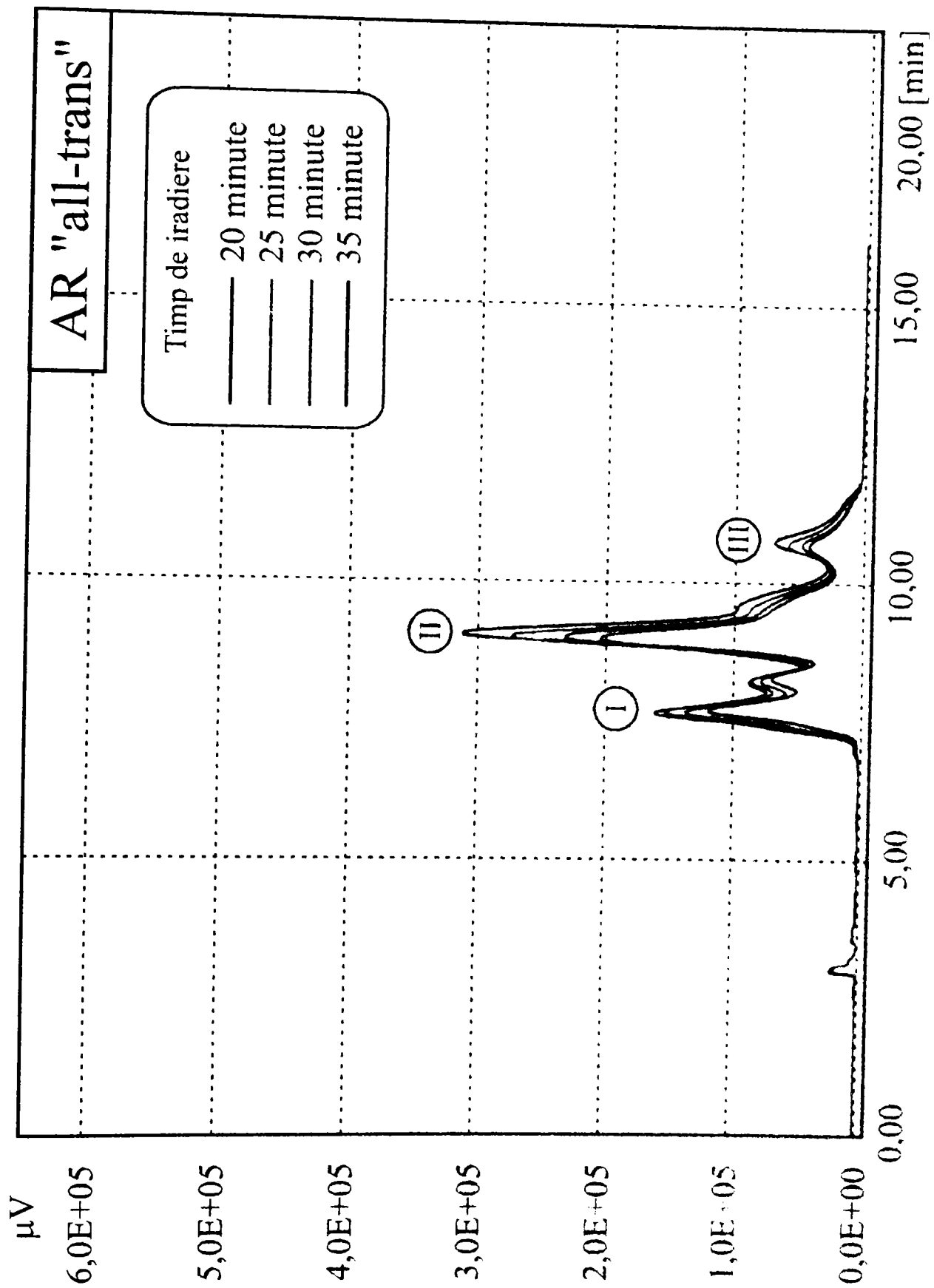
**Dipolmoment molecular (Debye) 2.428**

**Căldura de formare (kcal/mol) -70,271**



- Fig. 3.1 -

Forma cromatogramelor suprapuse, obținute ca urmare a iradierii  
(interval de timp 0 - 15 minute)



- Fig. 3.2 -

Forma cromatogramelor suprapuse, obținute ca urmare a iradierii  
(interval de timp 20 - 35 minute)

Fig. 3.3  
Curba cinetica de transformare a AR "all-trans"

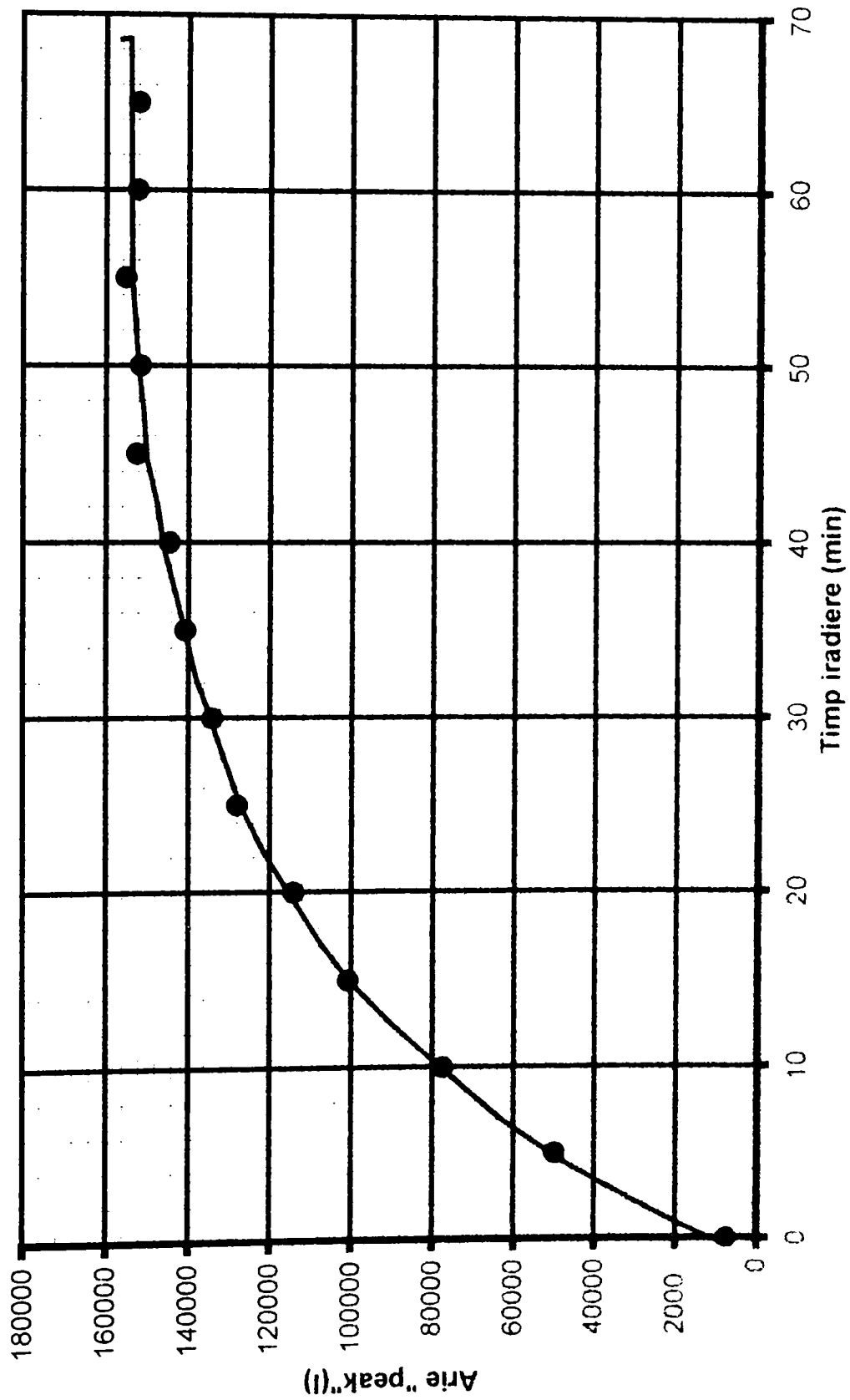


Fig. 3.4 -  
Curba cinetica de transformare a AR "all-trans"

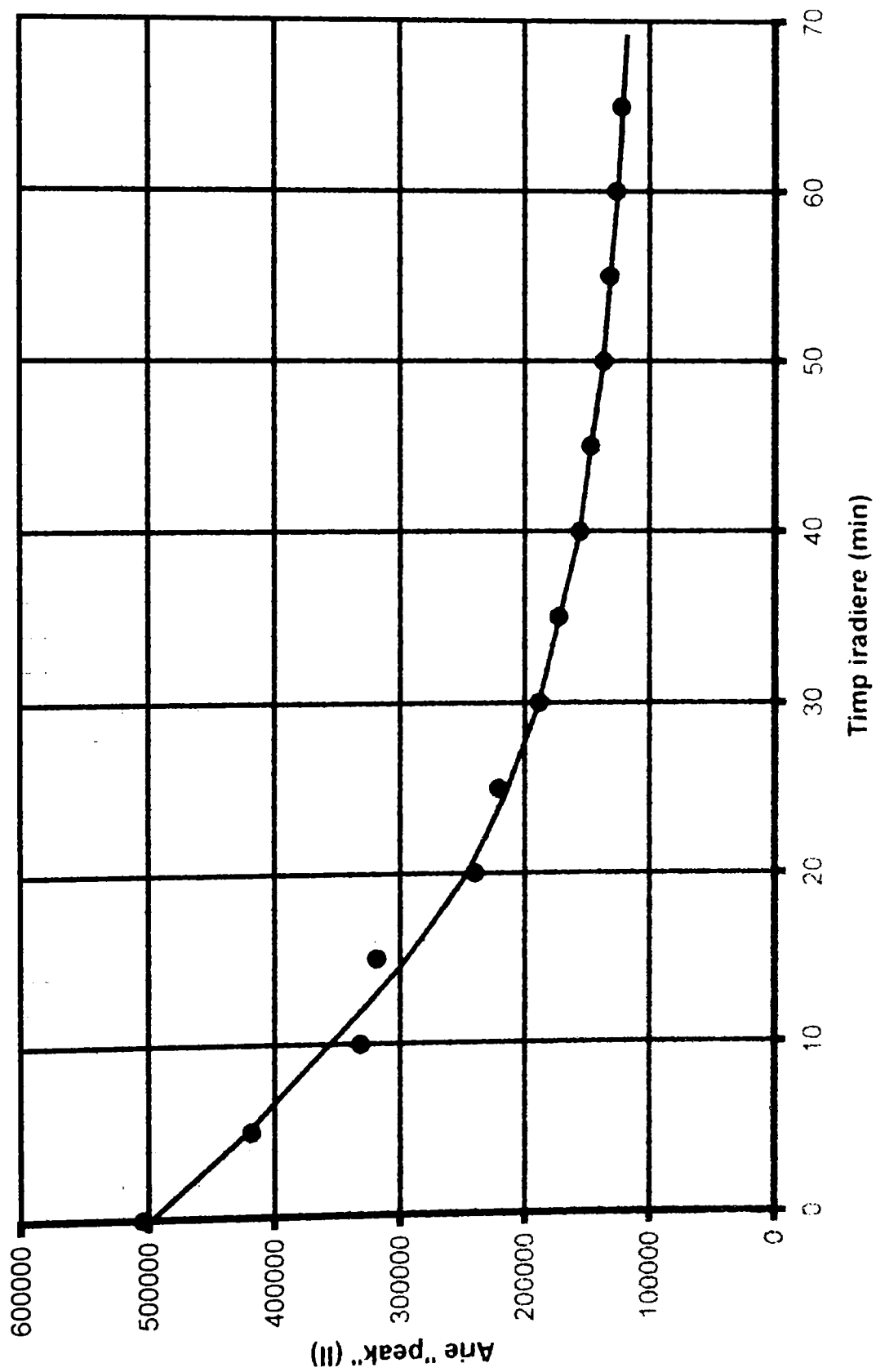


Fig. 3.5  
Curba cinetica de transformare a AR "all-trans"

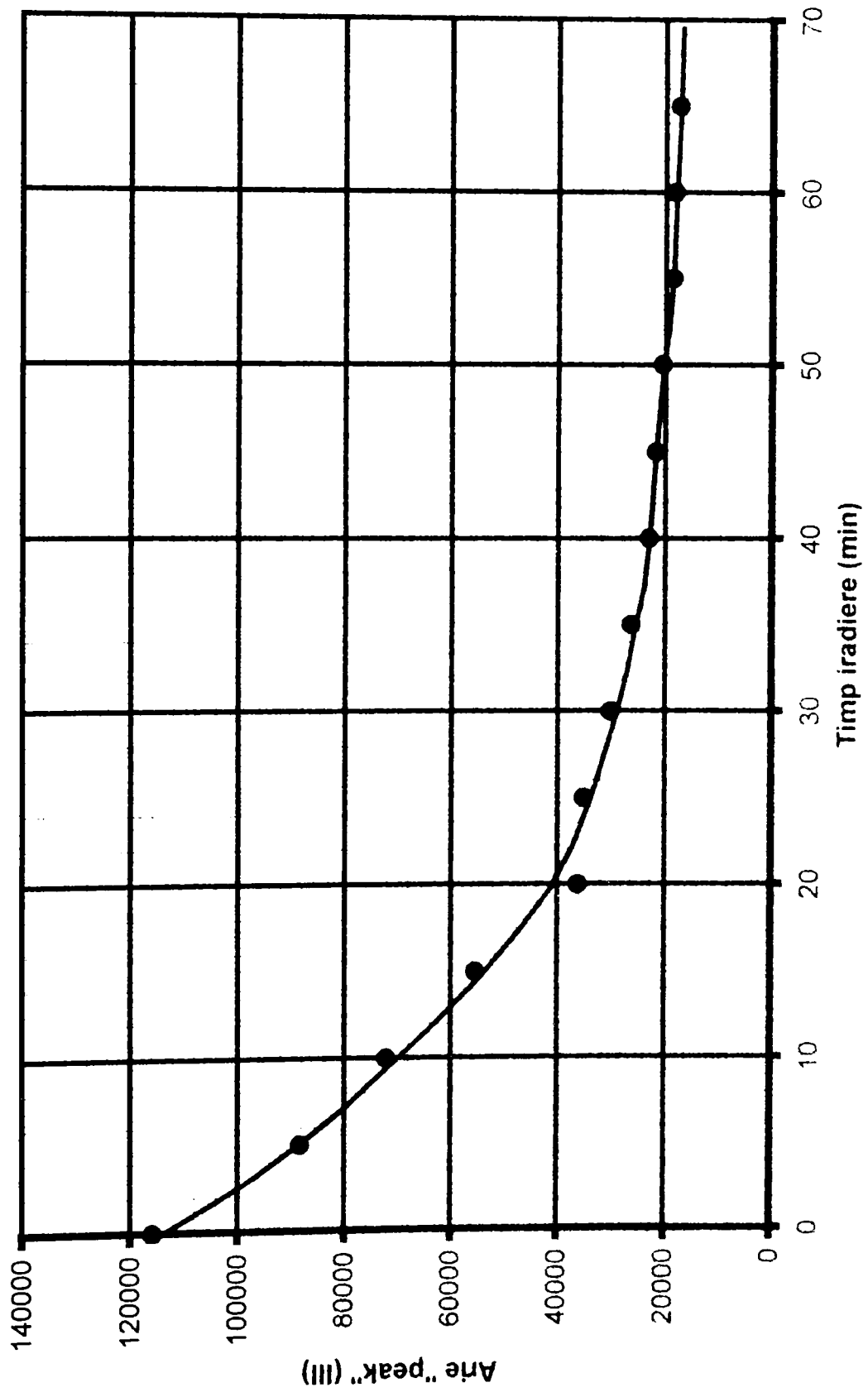


Fig. 3.6  
Curba cinetica de transformare a AR "all-trans"

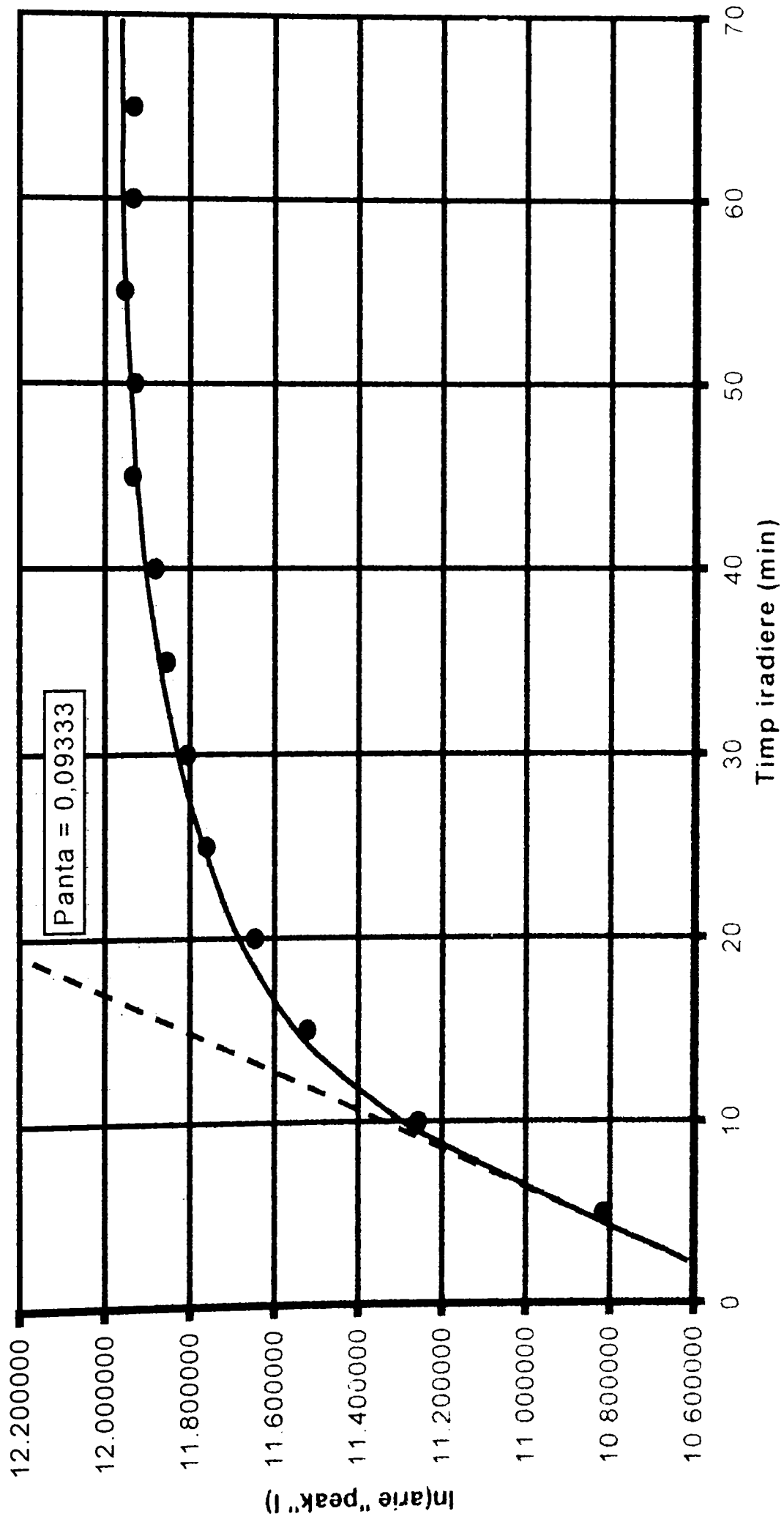


Fig. 3.7  
Curba cinetica de transformare a AR "all-trans"

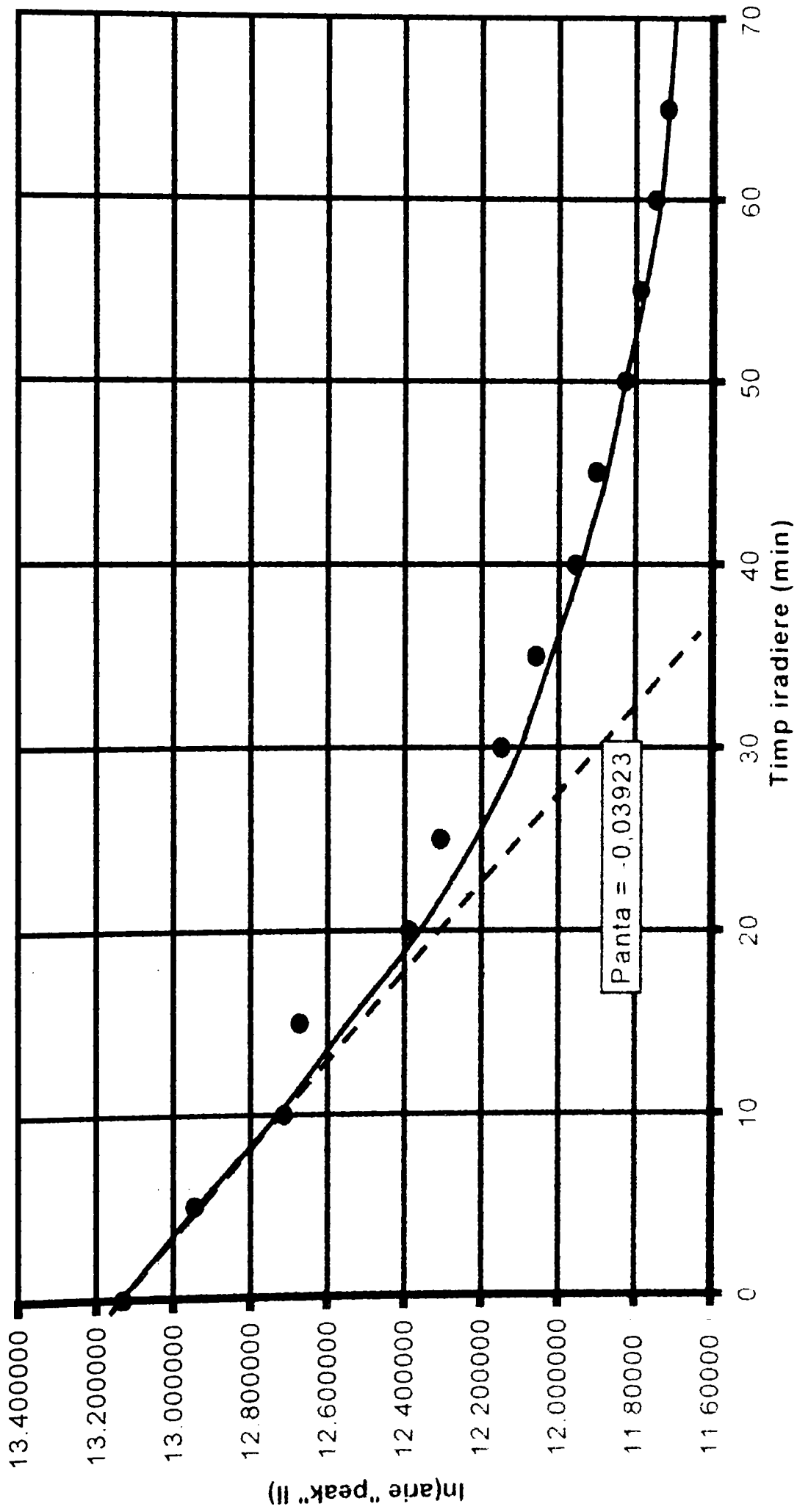
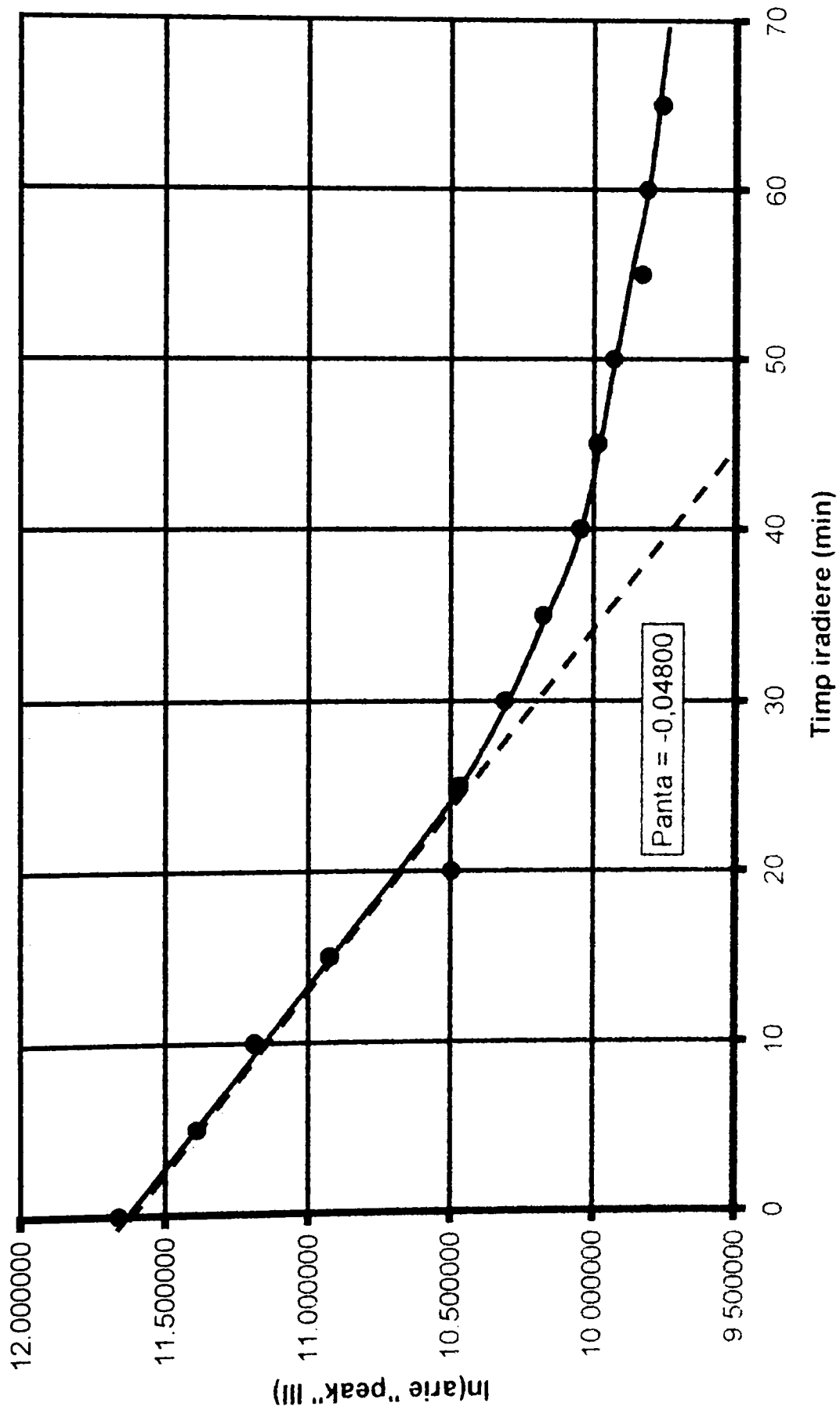
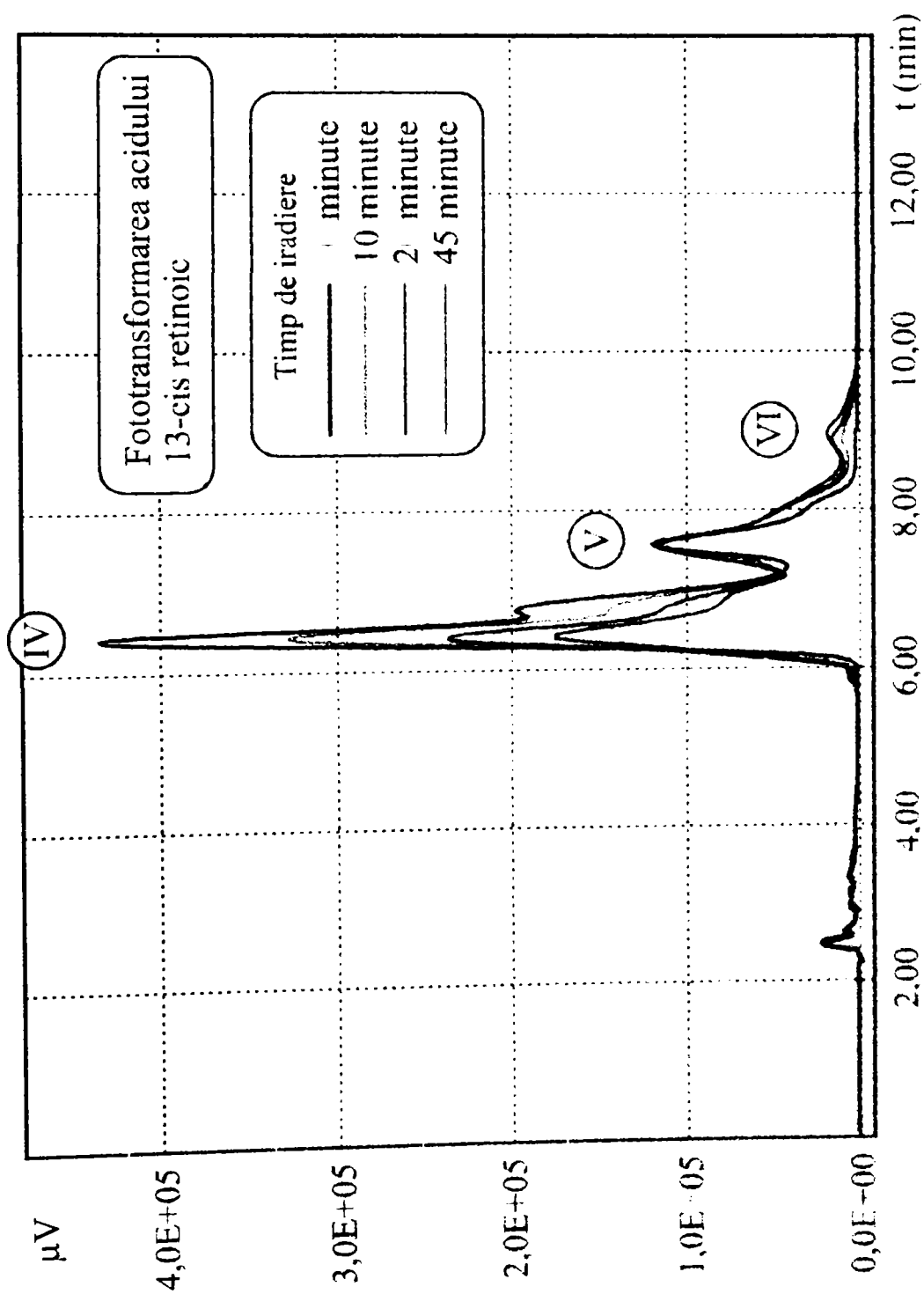




Fig. 3.8  
Curba cinetica de transformare a AR "all-trans"





- Fig. 3.9 -  
**Forma cromatogramelor suprapuse, obținute ca urmare a iradierii (interval de timp 0 - 45 minute)**

Fig. 3.10

Curba cinetica de transformare a AR 13-cis

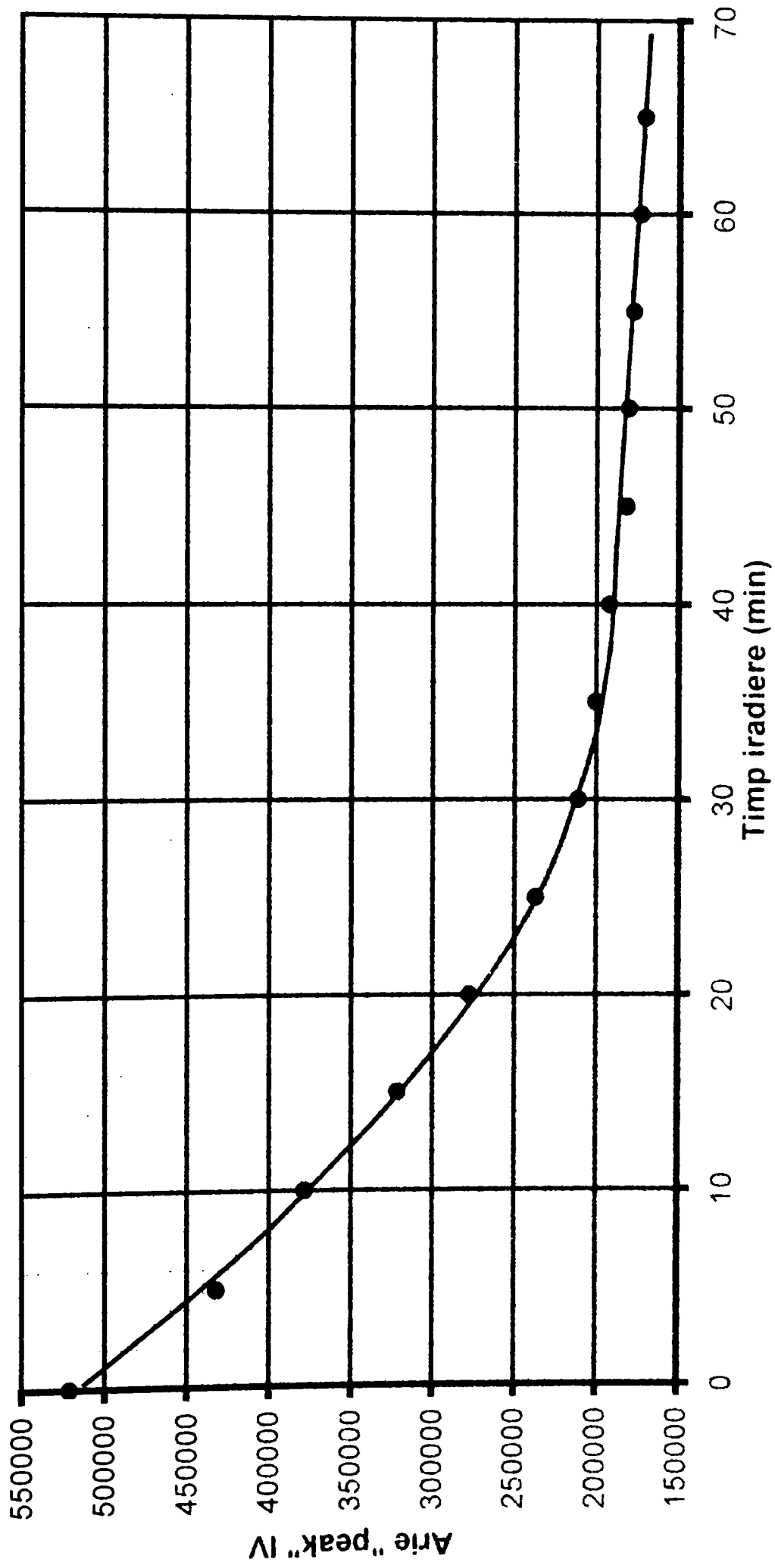


Fig. 3.11  
Curba cinetica de transformare a AR 13-cis

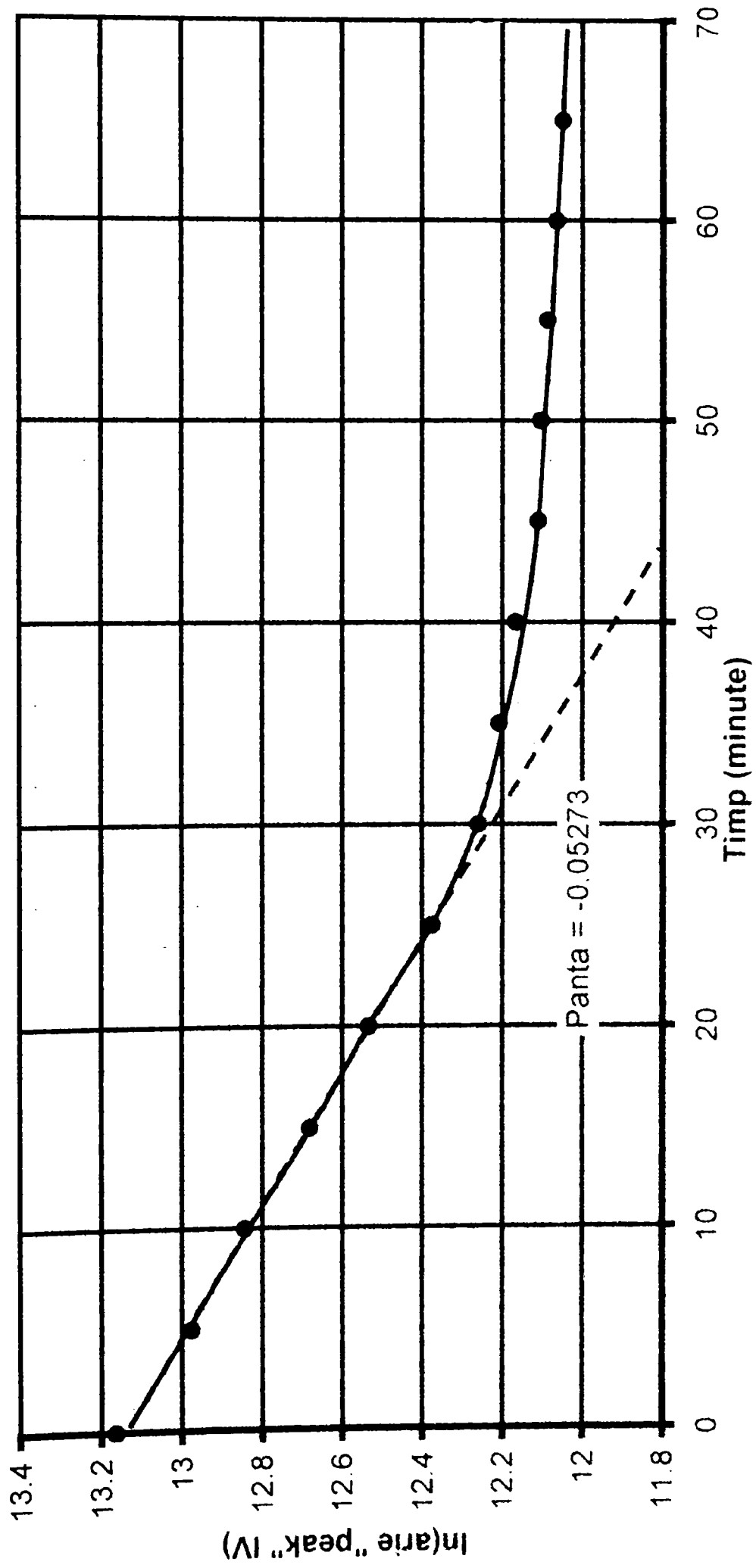


Fig. 3.12

Curba cinetica de transformare a AR "all-trans", in prezenta 5(6)-metil-benzotriazolului

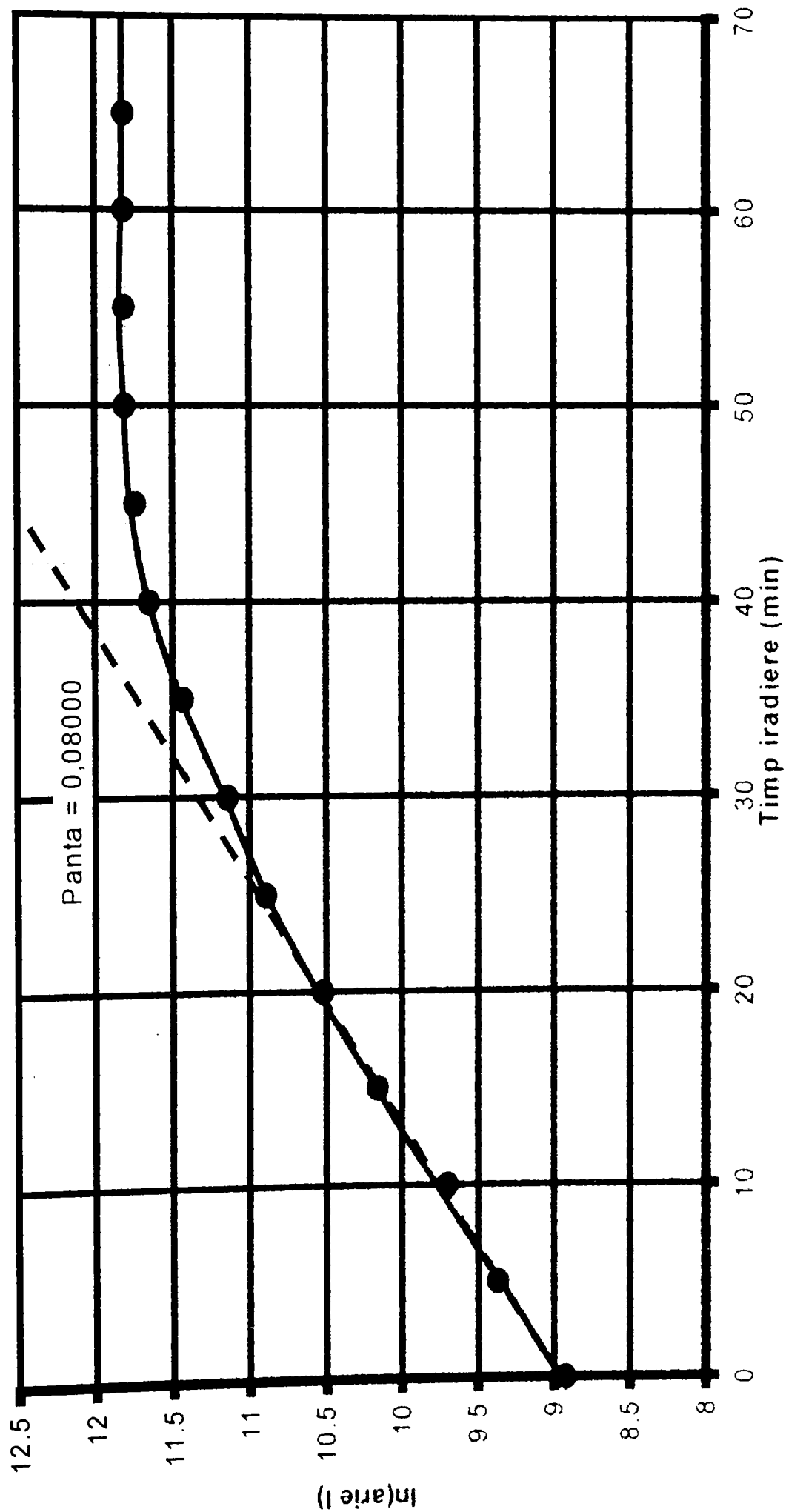


Fig. 3.13

Curba cinetica de transformare a AR "all-trans", in prezenta 5(6)-metil-benzotriazolului

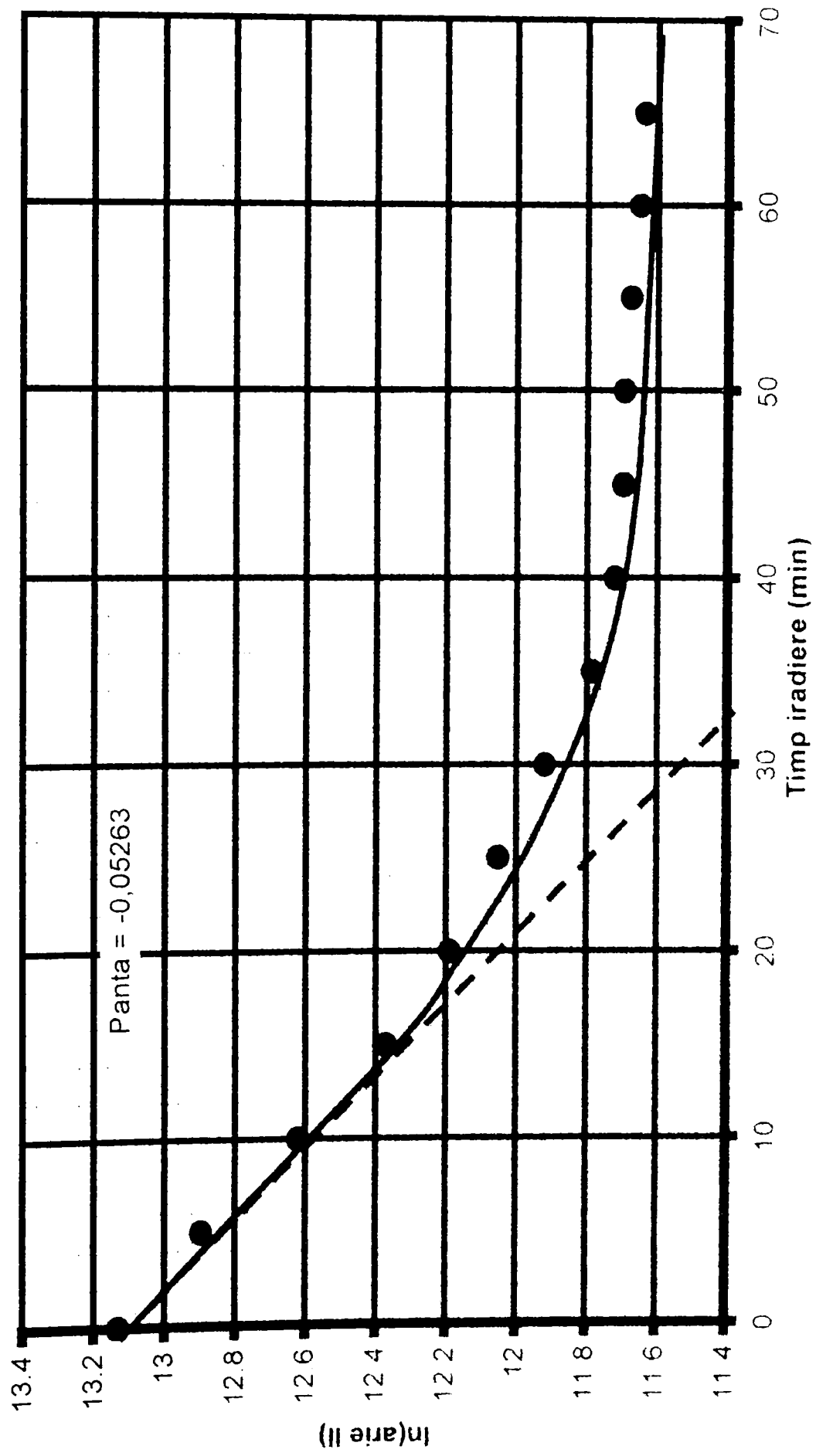
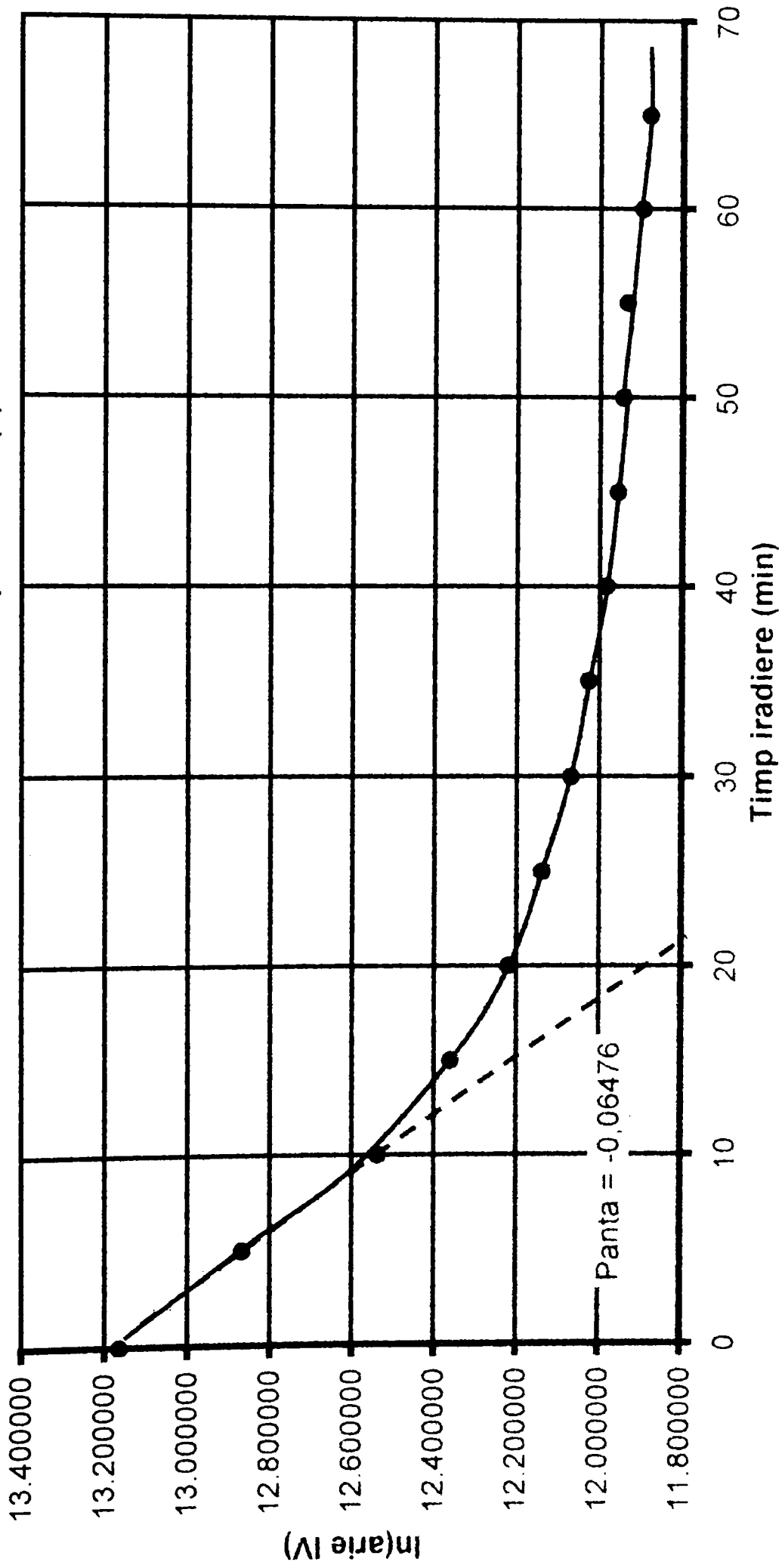
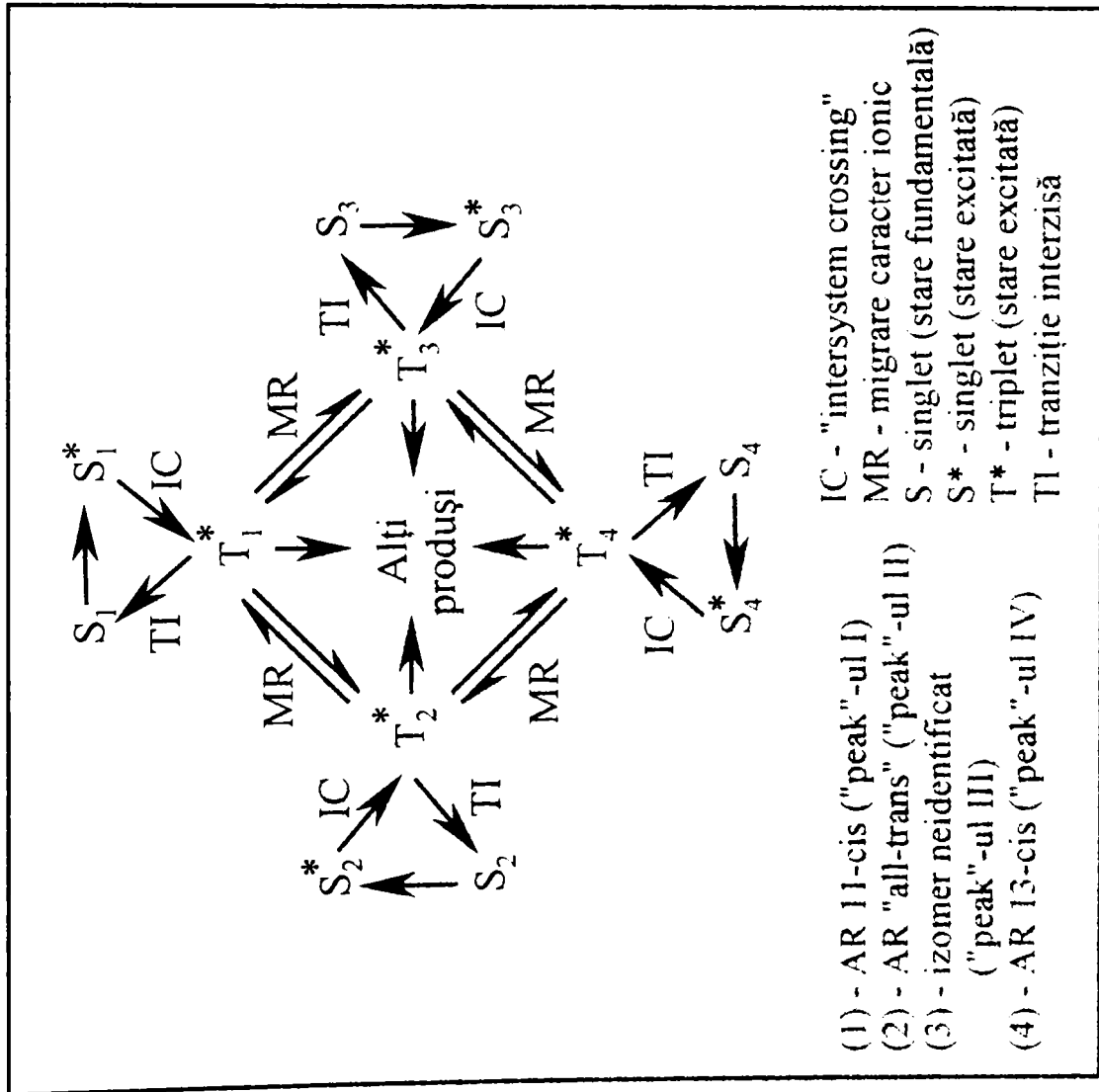


Fig. 3.14

Curba cinetica de transformare a AR 13-cis în prezenta 5(6)-metil-benzotriazolului





- Fig. 3.15 -  
 Schema posibilă a fototransformărilor izomerilor AR



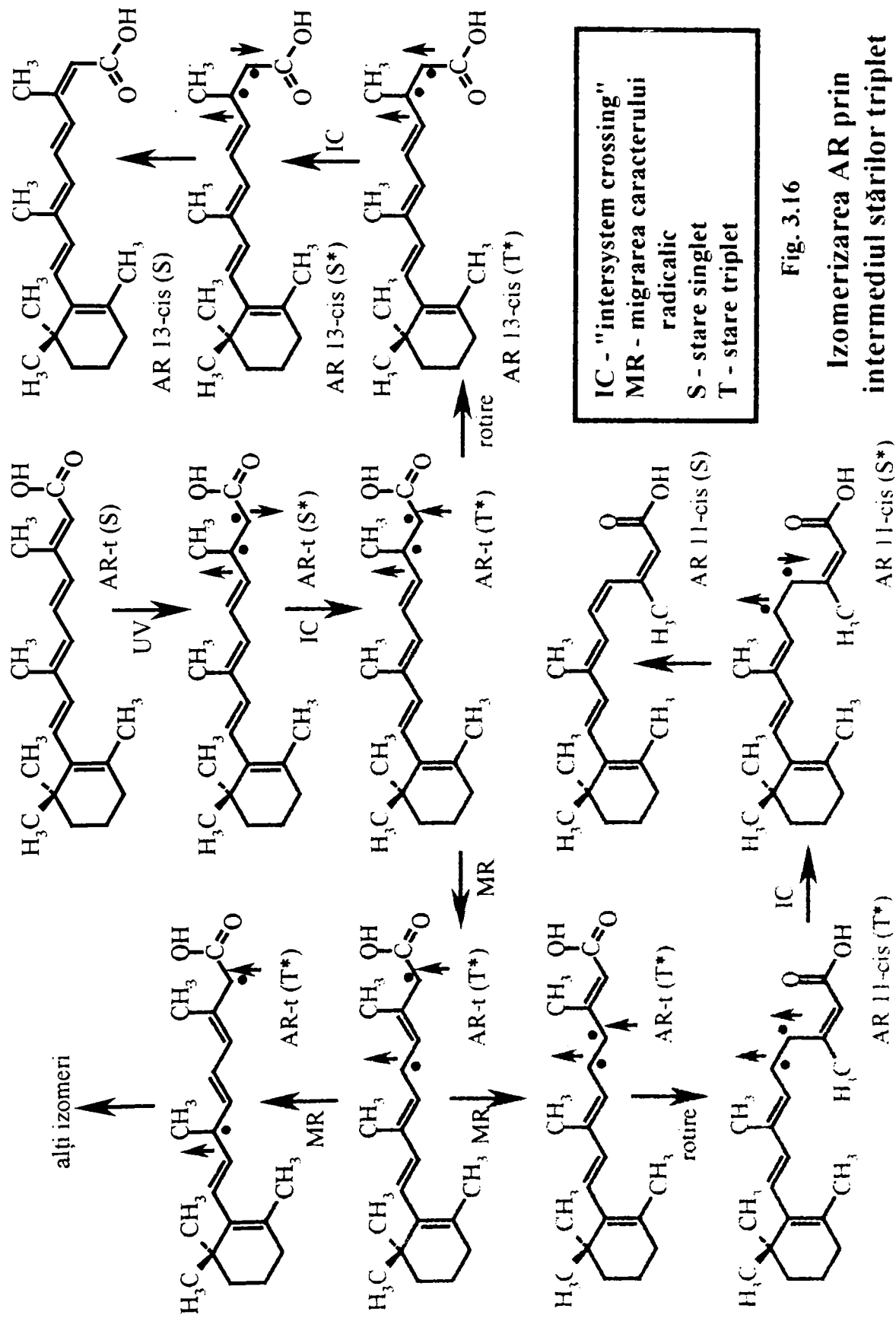
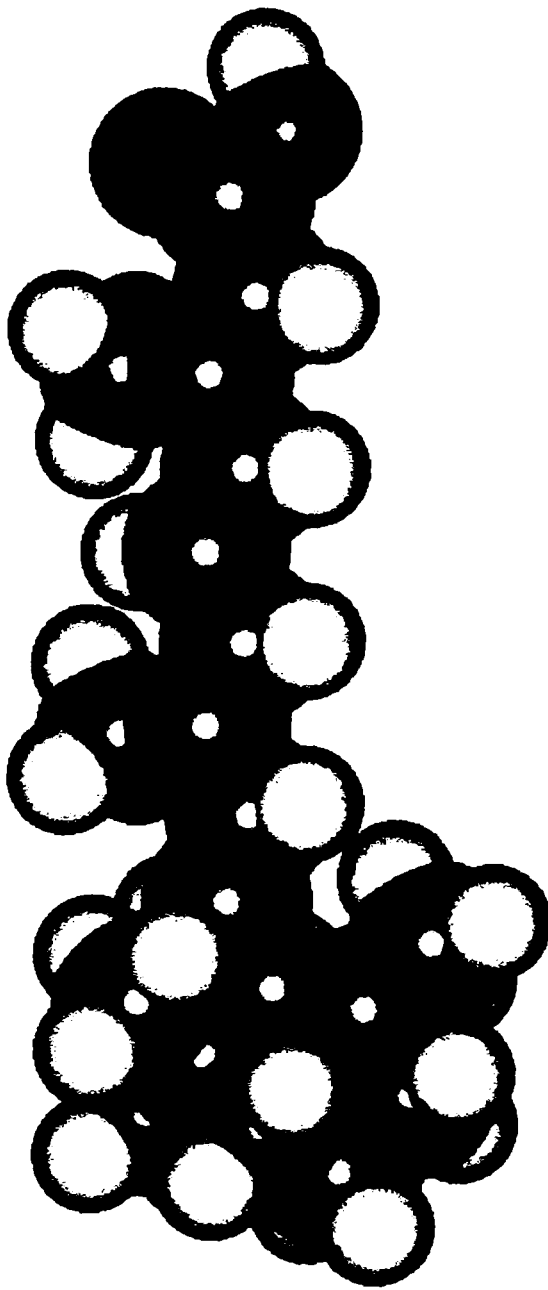
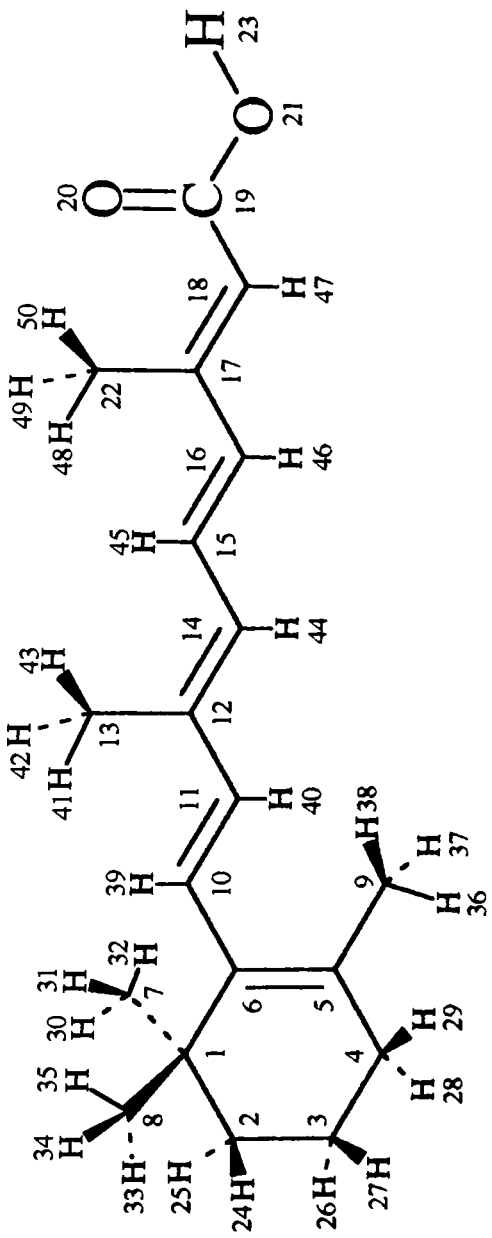


Fig. 3.16

Izomerizarea AR prin intermediul stărilor triplet



- Fig. 3.17 -  
 Numerotarea atomilor și modelul molecular al AR all-trans

### 3.5. Concluzii

În intenția explicării fenomenului de fotosensibilizare cutanată a acidului retinoic all-trans, a fost emisă ipoteza formării, în timpul iradierii, a unor stări staționare excitate, cu viață suficient de lungă pentru a se putea manifesta ca specie chimică reactivă, iritantă.

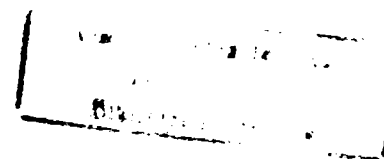
În vederea argumentării acestei ipoteze a fost urmărită cinetica fototransformării acidului retinoic all-trans la doze de iradiere reduse. S-a constatat, în concordanță cu câteva date din literatura de specialitate, faptul că acidul retinoic all-trans se transformă, cu conversie rezonabilă, în izomerul 11-cis și în alt (alți) izomer(i) sau în alți produși de reacție.

Un studiu similar, executat cu acidul retinoic 13-cis, a evidențiat un tablou cinetic diferit: semnalul HPLC al izomerului 13-cis se consumă din sistem în urma iradierii dar, spre deosebire de cazul acidului retinoic all-trans, nu apare (cu conversie demnă de menționat) un alt stereoizomer. Acidul retinoic all-trans se formează dar cu conversie foarte mică. În acest caz deci, domină degradarea acidului retinoic 13-cis cu formarea unor fragmente care nu se evidențiază prin HPLC în condițiile de lucru ale experiențelor.

Faptul că atât fototransformarea AR-all-trans, cât și cea a AR 13-cis are loc prin intermediul unor stări cu caracter (bi)radicalic (stări electronice triplet), este susținută de observația conform căreia un captator tipic de radicali liberi - 5(6)-metil-benzotriazolul - modifică viteza ambelor procese.

Pe baza datelor experimentale s-a conturat imaginea următoare a desfășurării fototransformărilor: prin absorbția fotonilor de energie convenabilă sistemul electronic al materiilor prime (AR all-trans și AR 13-cis) este excitat la starea staționară singlet de energie joasă (stare cu viață scurtă), iar din această stare sistemul poate reveni în starea fundamentală, pe de o parte, sau poate trece într-o stare cu caracter triplet având energia mai joasă decât starea excitată singlet (prin "intersystem crossing"). Tranziția din stările excitate triplet spre starea fundamentală (singlet) teoretic este interzisă, însă datorită vibrației scheletului molecular, acest tip de tranziție se realizează dar cu probabilitate mică, motiv pentru care stările triplet au viață mult mai lungă decât stările singlet.

Prezența captatorului de radical mărește viteza de consumare a materiei prime și micșorează viteza de formare a altui (altor) stereoizomeri. Faptul că prezența captatorului afectează nu numai viteza de formare a produsului, dar și



viteza de consum a materiei prime, sprijină afirmația de mai sus anume, că sistemul poate trece prin tranziția interzisă triplet-singlet, în starea fundamentală.

Efectul de modificare a vitezei de consum a materiei prime prin prezența captatorului de radicali dovedește și faptul că formarea altor stereoizomeri decurge prin intermediul unor stări triplet. Ideea izomerizării prin intermediul stării triplet este condiționată de timpul de viață suficient de lung al acestor stări pentru a se putea desfășura migrarea electronilor neîmperecheați de-a lungul catenei și pentru a se realiza rotirea unei părți a moleculei în jurul unei legături  $\sigma$ .

Posibilitatea existenței stărilor triplet între starea fundamentală și prima stare excitată singlet a fost argumentată, atât pentru molecula AR all-trans cât și pentru AR 13-cis, prin calcule de chimie cuantică executate cu metode semiempirice evoluate (PM3). Tot aceste calcule evidențiază faptul că energia necesară primei tranziții singlet-singlet este apropiată de energia fotonilor emiși de sursa de radiații care a fost utilizată pentru iradierea AR.

Datele experimentale susțin formarea speciilor biradicalice în timpul iradierii cu radiația ultravioletă apropiată. Aceste specii pot fi răspunzătoare pentru fotosensibilizarea cutanată observată la aplicarea pe piele a unor preparate dermatologice și cosmetice cu conținut de acid retinoic.

### 3.6. Bibliografie

1. Ottolenghi M., în *"Advances in Photochemistry"*, Noyes W.A. jr., Hammond G., Pitts J.N. jr., Editori, Interscience Publ. 1966, vol. 12, p. 97 – 180.
2. Lo K.K.N., Land E.J., Truscott T.G., *Photochem. Photobiol.*, 36, 139-143, 1982.
3. Cahnmann H.J., *Anal. Biochem.*, 227, 49 – 53, 1995.
4. Ferguson J., Johnson B.E., *Pharmac. Ther.*, 40, 123 – 135, 1989.
5. McKenzie R.M., Hellwege D.M., McGregor M.L., Rockley N.L., Riquetti P.J., Nelson E.C., *J. Chromatogr.*, 155, 379 – 387, 1978.
6. Stewart J.J.P., *J. Comput. Chem.*, 10, 209, 1989.
7. Stewart J.J.P., *J. Comput. Chem.*, 10, 221, 1989.
8. Stewart J.J.P., *J. Computer-Aided Mol. Design.*, 4, 1, 1990.
9. Thiel W., *Tetrahedron*, 44, 7393, 1988.
10. Dewar J.S., Dieter K.M., *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 8075, 1986.

## CONCLUZII GENERALE

Deși la finele fiecărui paragraf au fost prezentate concluzii și s-au purtat discuții ample și la obiect am considerat necesară reluarea pe scurt a acestora pentru a oferi o imagine de ansamblu a realizărilor prezentate în teza de față.

Urmărind ordinea prezentării de-a lungul tezei, principalele concluzii se pot sumariza după cum urmează:

Terapia vectorizată este un domeniu modern al terapiei medicamentoase. Ea urmărește realizarea unei distribuții specifice a substanțelor medicamentoase în organism, facilitând și traversarea unor bariere biologice prin căi specifice. Concomitent optimizează acțiunea substanței medicamentoase și reduce potențialul de manifestare al efectelor secundare.

Obiectivele cercetării din prezenta lucrare au fost: prepararea, caracterizarea și evaluarea *in vivo* a unui sistem microparticulat de transport la țintă (lipozomi) încărcat cu acid retinoic și formularea unui dermopreparat ce include acest sistem vectorizat; explicarea fenomenului de fotosensibilizare cutanată indusă de acidul retinoic, pe baza intermediarilor reactivi în stare electronică triplet, formați în urma iradierii substanței medicamentoase cu o anumită doză de iradiere, având o lungime de undă potrivită.

Lipozomii multilamelari s-au preparat prin metoda hidratării filmului fosfolipidic, separarea de substanța neîncapsulată realizându-se prin trecere pe coloana de Sephadex. Lipozomii obținuți au fost examinați la microscopul electronic de transmisie și s-a constatat forma lor aproape sferică și un diametru mediu de 450 nm. Prin ultrasonicarea dispersiei lipozomiale, diametrul mediu a scăzut la 350 nm și concomitent s-a redus și polidispersia veziculelor. S-au studiat factorii care influențează incorporarea acidului retinoic în lipozomi și s-a determinat că încorporarea relativă I.R.(%) crește cu creșterea raportului molar fosfatidil-colină / acid retinoic (Fc/AR) (la raportul molar 1,27 : 0,36, IR = 29,7% față de 19,7% la raportul molar 0,25 : 0,36), în timp ce prezența colesterolului în structura învelișului fosfolipidic al lipozomilor a scăzut cantitatea de acid retinoic încorporat în vezicule.

Stabilitatea lipozomilor a fost evaluată prin determinarea cantității de acid retinoic rămasă încapsulată, la anumite intervale de timp, în funcție de raportul molar Fc / AR. S-a stabilit că lipozomii pierd în timp o anumită cantitate de medicament încorporat. Lipozomii preparați cu o concentrație de lipide mai mare, deci prin creșterea raportului Fc / AR, au prezentat o scădere mai mică a conținutului medicamentos față de alte formulări, deci o creștere a stabilității.

S-a obținut și un preparat de uz dermatologic sub formă de hidrogel cu acid retinoic 0,01% inclus în lipozomi, în care substanța medicamentoasă asigură o concentrație terapeutică. Metoda de preparare a hidrogelului și determinarea cantitativă a acidului retinoic din lipozomi și din hidrogel este accesibilă la nivel de laborator.

Stabilitatea gelului cu lipozomi încărcăți cu acid retinoic 0,01% s-a evaluat prin determinarea concentrației acidului retinoic din gel după stocare la diferite perioade de timp (după 3 luni, 6 luni, după un an) la temperatura camerei și s-a constatat o scădere a conținutului procentual al acidului retinoic în timp, dar procentul este în limita admisă de Farmacopea Română Ed. a X-a.

S-au evaluat și caracteristicile reologice ale gelului cu lipozomi cu acid retinoic 0,01%. Curba de curgere a preparatului menționat s-a determinat cu un vâscozimetru rotațional la preparare și în timpul stocării, la diferite perioade de timp de la preparare, la 20° C și s-a constatat comportamentul plastic al gelului. Valoarea punctului de curgere este relativ mică (250 dyn/cm<sup>2</sup>) la preparare, cât și după un interval de 6 luni (500 dyn/cm<sup>2</sup>), ceea ce permite o etalare ușoară a preparatului pe tegument. S-a mai constatat că în timp structurarea excipientului nu este însemnată, ceea ce pledează pentru păstrarea caracteristicilor reologice pe perioada de timp studiată.

S-a evaluat acțiunea locală *in vivo* a unor preparate lipozomice și non-lipozomice cu acid retinoic, pe urechea de iepure New Zealand. Preparatele galenice gel cu acid retinoic 0,01% inclus în lipozomi, gel cu acid retinoic 0,01% și crema Airol® (acid retinoic 0,05%) produs al firmei Hoffman La Roche au fost administrate zilnic prin metoda de badijonare pe tegumentul urechii de iepure timp de două săptămâni. În a patra și a opta zi de tratament s-au prelevat chirurgical biopsii pentru evaluarea histologică. Modificările morfologice principale evidențiate histologic (prin diferite metode de colorare) în secțiunile

de tegument au fost următoarele: hiperplazia epidermului, cornificarea și descuamarea stratului cornos, acumularea masivă de granulocite în dermul papilar, stimularea sintezei de colagen, degenerarea sau necroza glandelor sebacee, ulceratii ale epidermului (în cazul lotului tratat cu Airol<sup>®</sup>). Pe baza rezultatelor obținute s-a propus și un model ipotetic al modului de acțiune a acidului retinoic privind diferențierea epidermului *in vivo*.

A fost evaluată și toleranța cutanată a hidrogelului cu lipozomi cu acid retinoic 0,01% comparativ cu alte formulări non-lipozomice cu acid retinoic. Suprafața testată prin metoda badijonării a fost fotografiată în ziua a 7-a și a 14-a a experimentului. Toleranța cutanată a fost evaluată obiectiv, luând în considerare gradul de iritație al pielii pe o scală de la 0 (preparat tolerat) la 3 (iritație foarte intensă). Rezultatele obținute au evidențiat că preparatul gel cu acid retinoic 0,01% inclus în lipozomi a fost foarte bine tolerat și nu a produs iritație locală, fiind posibil ca învelișul fosfolipidic prin protejarea substanței active să diminueze semnificativ fenomenul de fotosensibilizare. Gelul cu acid retinoic 0,01% neinclus în lipozomi a fost apreciat cu toleranță mediocră. Preparatul comercial Airol<sup>®</sup> cremă (0,05% acid retinoic) a produs după 7 zile o reacție locală cu eritem intens, leziuni erozive și ulceratii superficiale (manifestări specifice fenomenului de fotosensibilizare cutanată), necesitând întreruperea tratamentului.

S-a studiat efectul încorporării acidului retinoic în lipozomi asupra farmacocineticii acestuia, la șobolani. Prin includerea acidului retinoic în lipozomi, farmacocinetica s-a modificat, având loc creșterea biodisponibilității, deci realizarea unor concentrații medicamentoase mai mari în plasmă și creșterea eficacității substanței. Eliminarea din plasmă și din alte organe este mai lentă, fapt susținut de scăderea clearance-ului și de prelungirea timpului de înjumătățire.

În literatura de specialitate au fost formulate diverse păreri referitoare la cauza reacției de fotosensibilizare cutanată declanșată de acidul retinoic prezent în unele preparate dermatologice și cosmetice. Pentru explicarea fenomenului au fost invocate diferite cauze posibile și au fost incriminate diverse componente chimice, fie acidul retinoic însuși care ar acționa asupra vreunui mecanism biochimic, fie diverși metaboliți ai acidului retinoic. În prezenta lucrare se aduc argumente experimentale în favoarea explicării fenomenului de fotosensibilizare

cutanată pe baza intermediarilor reactivi de viață lungă, în stare electronică cu multiplicitate triplet, care se formează la iradierea acidului retinoic cu o doză de radiație având lungime de undă potrivită. Pentru argumentarea acestei ipoteze a fost urmărită cinetica fototransformării acidului retinoic all-trans și a stereoizomerului 13-cis, cu și fără captator de radicali liberi. Interpretarea comparată a rezultatelor a conturat un mecanism posibil al fotoizomerizării acidului retinoic, proces peste care se suprapun, cu o oarecare pondere, fenomene de fotofragmentare. Posibilitatea trecerii moleculelor de acid retinoic în stări triplet cu viață relativ lungă (suficient de lungă pentru ca această stare să se manifeste ca intermediar chimic reactiv și pentru ca, printr-un proces de migrare intramoleculară a sediului de caracter radicalic, să se producă izomerizarea) a fost susținută și prin calcule de chimie cuantică semiempirice (AM1, PM3). Din aceste calcule a rezultat și lungimea de undă a radiației primare care poate declanșa procesele fotochimice discutate. Lungimea de undă rezultată din calculele cuantochimice este inclusă în domeniul spectral de emisie (destul de îngust) al sursei de radiații care a fost utilizată în experiențele de fototransformare.

Departa de a lămuri complet procesul complex al fototransformărilor acidului retinoic, lucrarea formulează și susține cu argumente experimentale un scenariu posibil al acestor fenomene.

În marea lor majoritate studiile prezentate au fost publicate în reviste de specialitate și / sau comunicate la simpozioane și congrese și ele sunt incluse în listele bibliografice ale capitolelor corespunzătoare din teză.