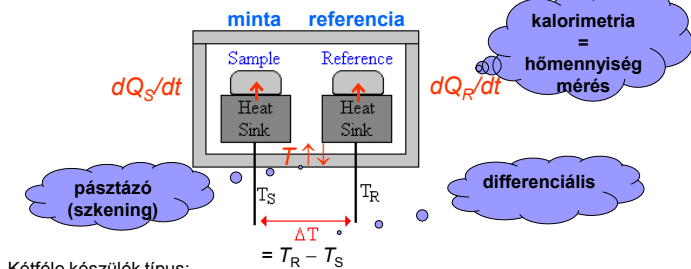


Kalorimetriás módszerek a liposzómák vizsgálatában

- DSC : differential scanning calorimetry
- ITC : isothermal titration calorimetry

1

DSC: differential scanning calorimetry differenciális pásztázó kalorimetria

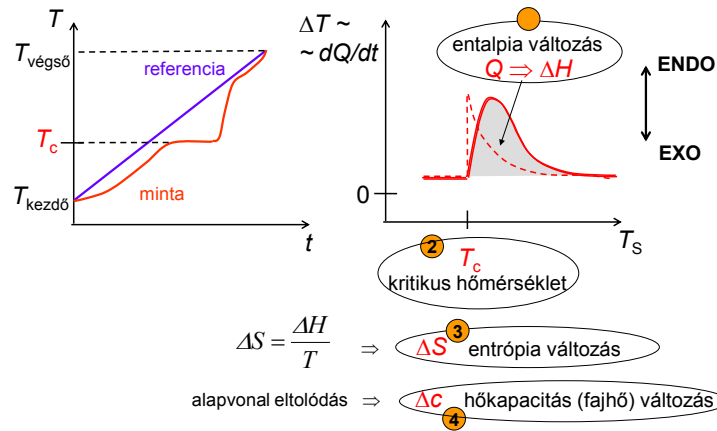


Kétféle készülék típus:

- 1 mért mennyiség: $\Delta T \Rightarrow$ fűtőtéljesítmény szabályozása, hogy $\Delta T = 0$ legyen \Rightarrow mért mennyiség: $dQ_S/dt - dQ_R/dt = dQ/dt$
- 2 mért mennyiség: $\Delta T \Rightarrow$ számolás: dQ/dt

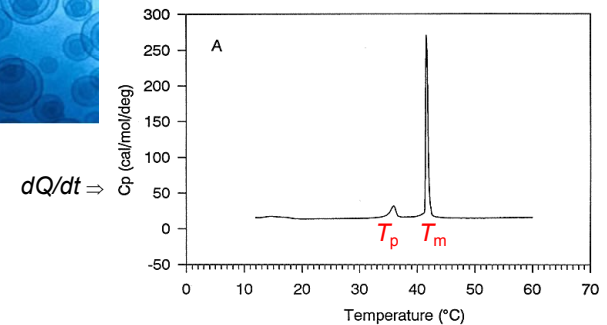
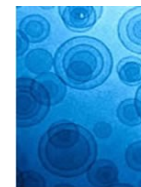
2

Termogram:

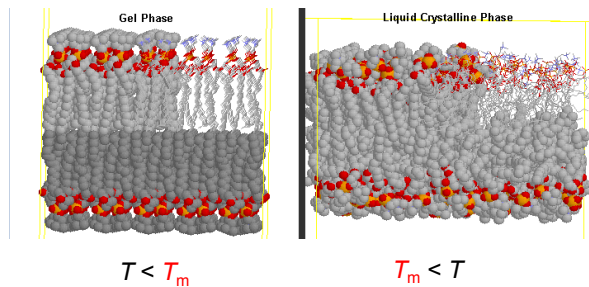


3

Példa: DPPC multilamelláris liposzóma

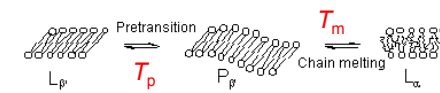
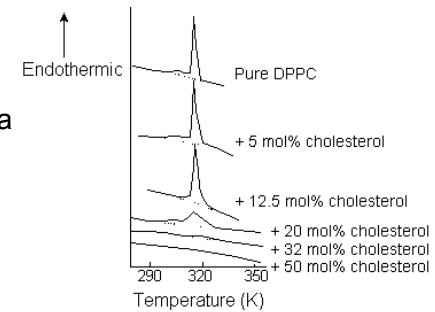


4



5

Példa:
koleszterin hatása
DPPC liposzóma
termogramjára

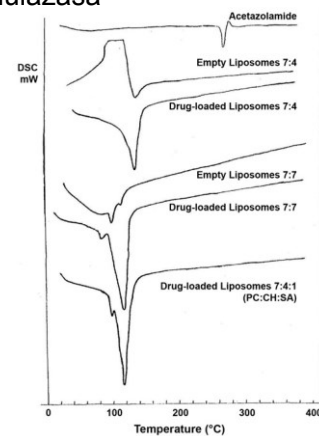
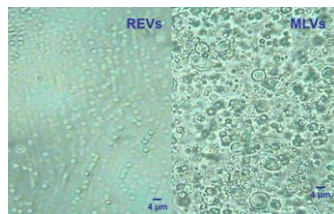


6

Példa: Acetazolamid formulázása

Glaukómában szem belnyomásának csökkentésére.
Mellékhatások: depresszió, veseelégtelenség, hányás, anorexia, ...
Lokális alkalmazás problémái: rossz vízdékonyság, kicsi permeabilitási együttható

➡ liposzóma
AAPS PharmSciTech 2007; 8 (1)



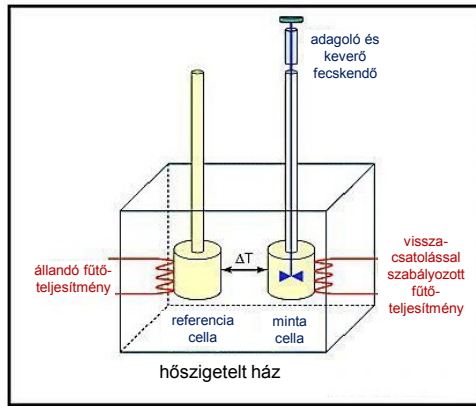
7

ITC: isotherm titration calorimetry
izoterm titrációs kalorimetria



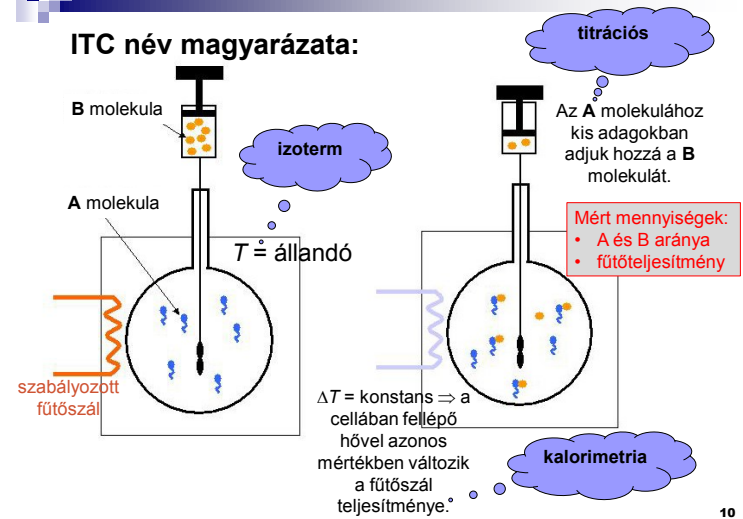
8

Felépítés:

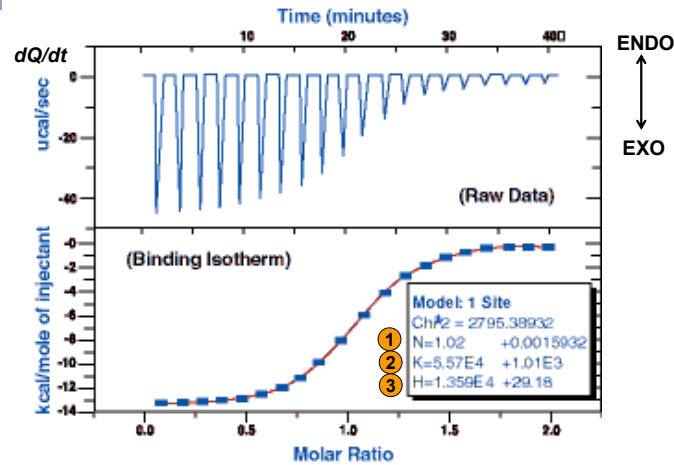


9

ITC név magyarázata:

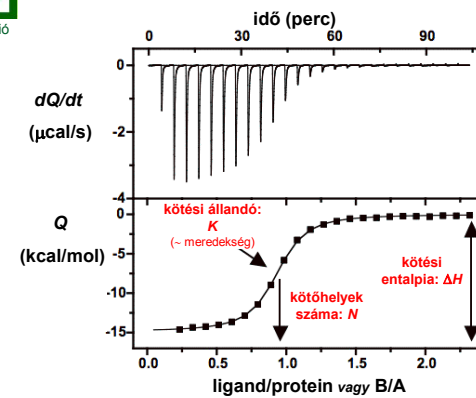


10



1 kötőhelyek száma 2 kötési állandó 3 kötési entalpia

11



12

Meghatározható mennyiségek:

$N, K, \Delta H +$

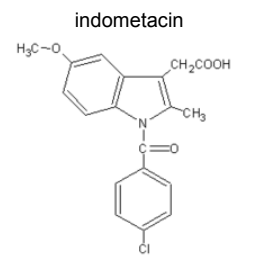
$$\left. \begin{aligned} \Delta G &= -RT \ln K \\ \Delta G &= \Delta H - T \cdot \Delta S \end{aligned} \right\} \textcircled{4} \Delta S \text{ kötési entrópia}$$

Példák orvosi/biológiai alkalmazásra:

- ✦ fehérje-fehérje kölcsönhatás
- ✦ fehérje-ligandum kölcsönhatás
- ✦ enzim-szubsztrát kötődés
- ✦ enzim-inhibitor kötődés
- ✦ lipid-lipid kölcsönhatás
- ✦ fehérje-lipid kölcsönhatás
- ✦ nukleinsav-fehérje kölcsönhatás
- ✦ nukleinsav-membrán kölcsönhatás
- ✦ oligomerizáció/disszociáció
- ✦ micella képződés
- ✦ gyógyszer-lipid/fehérje kölcsönhatás
- ✦ gyógyszer-felületaktív anyag khatás

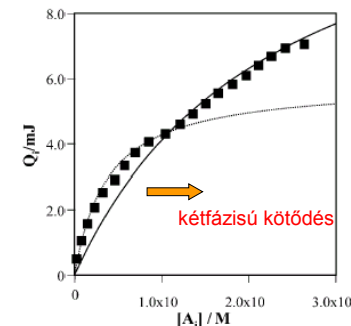
13

Példa: fájdalomcsillapító és liposzóma kölcsönhatása



Mellékhatások: gyomor-bél problémák (hányás, gyomorvérzés, ...)

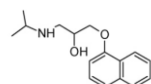
➔ liposzóma



Biophysical Journal Volume 86 February 2004 946-954
Interaction of Antiinflammatory Drugs with EPC Liposomes:
Calorimetric Study in a Broad Concentration Range

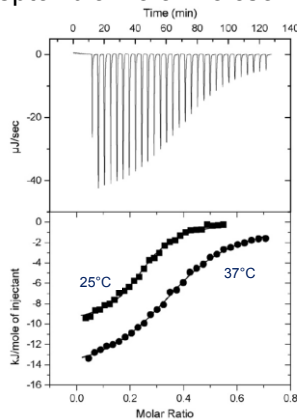
14

Példa: Béta-receptor blokkolók kölcsönhatása liposzómával



Propranolol

Liposzóma: POPC+POPG



Vizsgáltak:
✦ koncentráció
✦ ionerősség
✦ hőmérséklet
✦ liposzóma méret hatását.



Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 78 (2010) 275-282

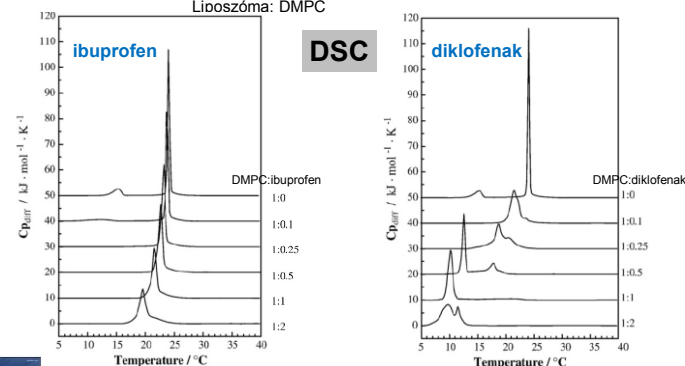
Microcalorimetric and zeta potential study on binding of drugs on liposomes

15

Példa: nem-szteroid gyulladásgátlók hatása a membránra

Nem-szteroid gyulladásgátlók: pl. ibuprofen, diklofenak, naproxen

Liposzóma: DMPC



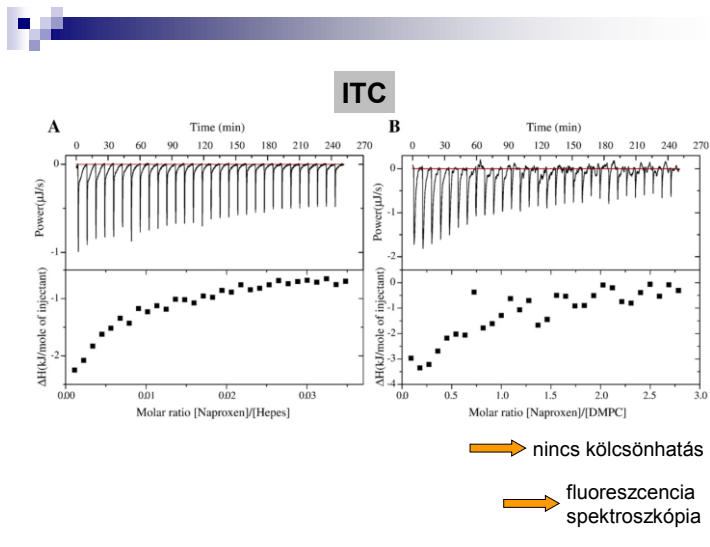
➔ kölcsönhatás



Biochimica et Biophysica Acta 1788 (2009) 1296-1303

The membrane-activity of Ibuprofen, Diclofenac, and Naproxen: A physico-chemical study with lecithin phospholipids

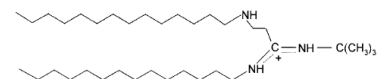
16



Példa: DNS és liposzóma kölcsönhatása

DNS transzfer → kationos liposzóma előnyök: gyengébb immun válasz, nagy „méretválaszték”, sejt specifikus liposzómák, ...

Liposzóma: diC14-amidin



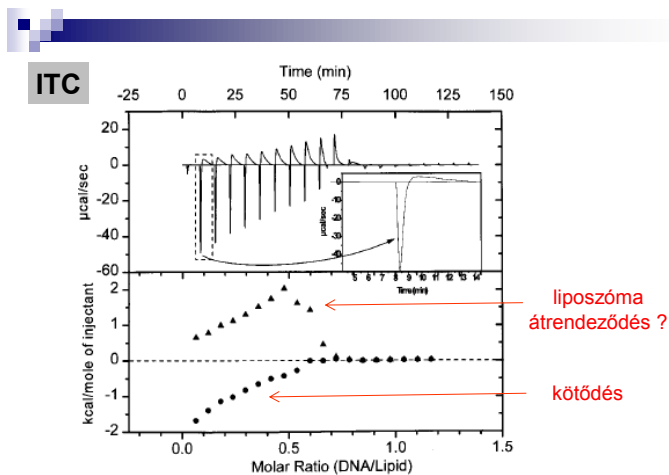
+ plazmid DNS

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
© 2000 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

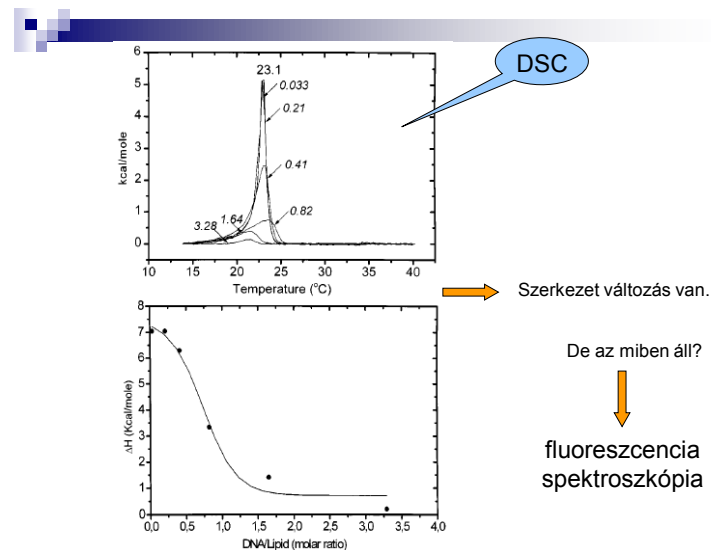
Vol. 275, No. 38, Issue of September 22, pp. 29533-29538, 2000
Printed in U.S.A.

Biophysical and Structural Properties of DNA-diC₁₄-amidine Complexes

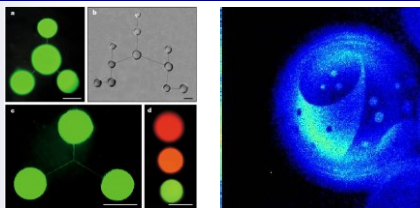
18



19



Fluoreszcenciás módszerek a liposzómák vizsgálatában



21

Fluoreszcencia

fluoreszcencia → lumineszcencia

Lumineszcencia: hőmérsékleti sugárzáson felüli többlet sugárzás.

Megfigyelések:

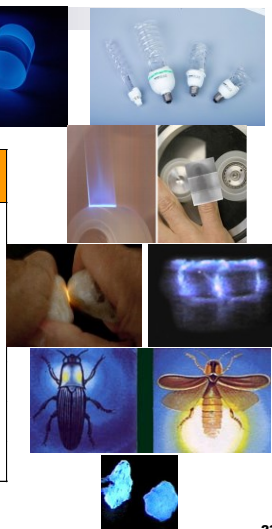
- „gyenge” kapcsolat a test hőmérsékletével → „hideg fény”
- vonalas, ill. sávos spektrum → elektrongerjesztés



22

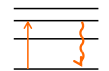
Gerjesztés szerint:

gerjesztés módja	elnevezés	példa
fény	fotolumineszcencia (fluoreszcencia)	kinin-szulfát, foszfor, ...
röntgensugárzás.	röntgenolumin.	NaI (TI)
radioaktív sugárzás.	radiolumin.	NaI (TI)
elektromos tér	elektrolumin.	higanygőzlámpa
mechanikai hatás	tribolumin.	kockacukor
kémiai reakció	kemolumin. (biolumin.)	szentjánosbogár
hő	termolumin.	CaSO ₄ (Dy)

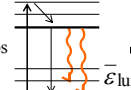


23

Lumineszcencia mechanizmusa

atom: $E = E_{el}$  gerjesztés emisszió → vonalas spektrum (pl. Na)

molekula: $E = E_{el} + E_v (+ E_r)$

 $\bar{\epsilon}_{abs}$ $\bar{\epsilon}_{lumin}$ → vonalas/sávos spektrum (pl. fluoreszcein)

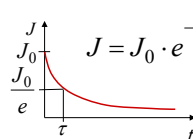
Stokes-eitoldódás: $\bar{\epsilon}_{lumin} \leq \bar{\epsilon}_{abs}$

↓ sugárzás nélküli átmenet
↓ sugárzásos átmenet

24

Lumineszcenciafény jellemzése

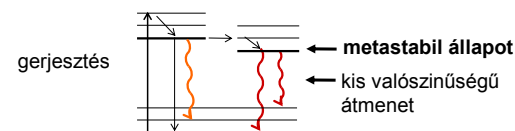
- vonalak, sávok helyzete, alakja, intenzitása
- Stokes-féle eltolódás [$\bar{\epsilon}_{\text{lumin}} \leq \bar{\epsilon}_{\text{abs}}$]
- kvantumhatásfok: $Q = \text{emittált fotonok száma} / \text{abszorbeált fotonok száma} (< 1)$
- élettartam:

$$J = J_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad \tau: \text{élettartam}$$




25

Fluoreszcencia és foszforeszcencia



fluoreszcencia foszforeszcencia

$$\bar{\epsilon}_{\text{phos}} \leq \bar{\epsilon}_{\text{fluo}} \leq \bar{\epsilon}_{\text{abs}}$$

$$\bar{\lambda}_{\text{abs}} \leq \bar{\lambda}_{\text{fluo}} \leq \bar{\lambda}_{\text{phos}}$$

$$\bar{\tau}_{\text{fluo}} \ll \bar{\tau}_{\text{phos}}$$

pl. triptofán:

$$\bar{\lambda}_{\text{fluo}} = 340 \text{ nm}$$

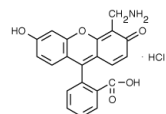
$$\bar{\lambda}_{\text{phos}} = 440 \text{ nm}$$

$$\tau_{\text{fluo}} = 0,1 - 5 \text{ ns}$$

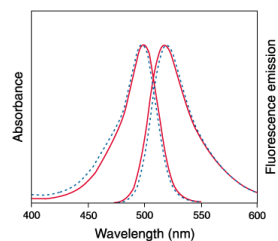
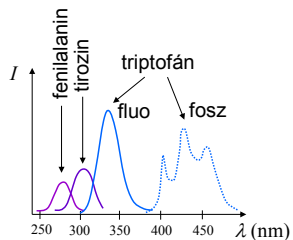
$$\tau_{\text{phos}} = 0,001 - 5 \text{ s}$$

26

Példák:

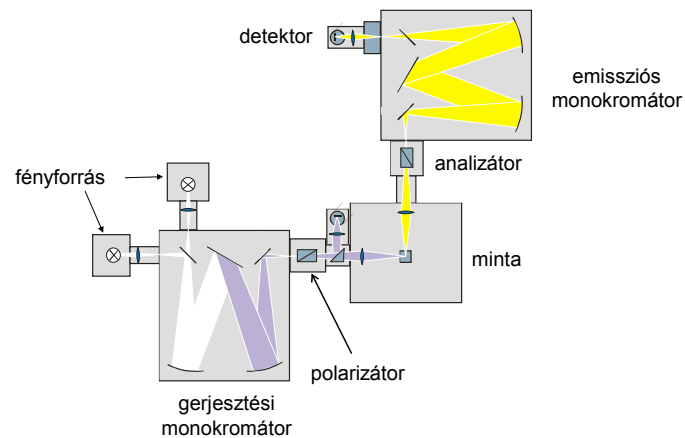


fluoreszcein



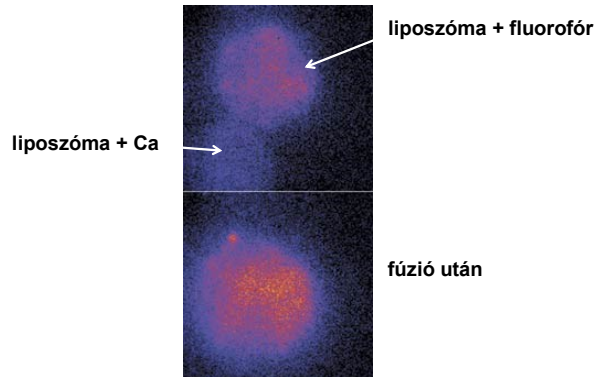
27

Mérés – luminométer felépítése



28

Példák:



29

DNS és liposzóma
köölcsönhatása
(folyt.):

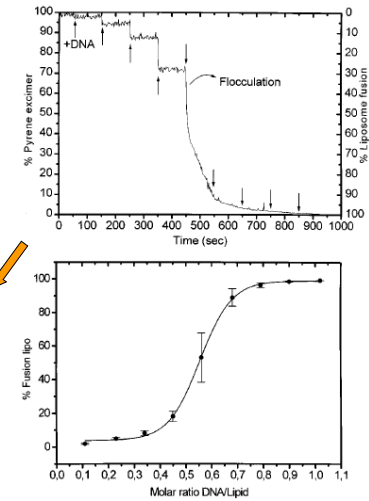
Fluorofór: pirén

Pirén excimer (~ koncentráció):

$\lambda_{\text{ger}} = 330 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 477 \text{ nm}$



pirén
fluoreszcenciája
csökken \Rightarrow fúzió

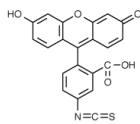


30

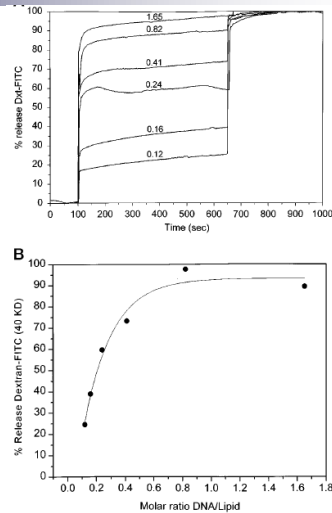
Fluorofór:

FITC-vel jelzett dextrán

(FITC: fluoreszcein-izotiocianát)

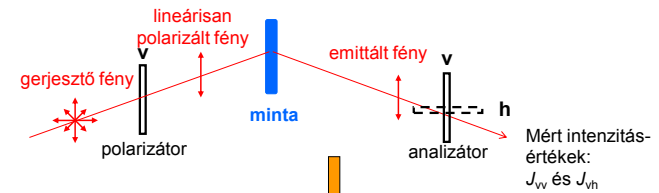


DNS destabilizálja a
liposzómákat \Rightarrow dextrán
kiáramlás, fúzió



31

Anizotrópia mérése



$$\text{anizotrópia } (r): \quad r = \frac{J_{vv} - J_{vh}}{J_{vv} + 2 \cdot J_{vh}} = \frac{J_{vv} - J_{vh}}{J} \quad 0 \leq r \leq 1$$

1 helyett a maximális érték r_0

32

Perrin-egyenlet: $r = \frac{r_0}{1 + \tau / \phi}$ ϕ : rotációs diffúzió korrelációs ideje

$$\phi = \frac{\eta \cdot V}{kT}$$

η : viszkozitás
 V : molekula(rész) térfogata
 k : Boltzmann-állandó
 T : hőmérséklet

η : mikroviszkózitás
 $(1/\eta)$: mikrofluiditás

Az anizotrópia értékek átszámolhatók mikroviszkózításra.
 Nagyobb anizotrópia nagyobb mikroviszkózítást jelent.

33

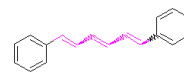
Liposzóma mikroviszkózítása a hőmérséklet függvényében:

Liposzóma: DPPC

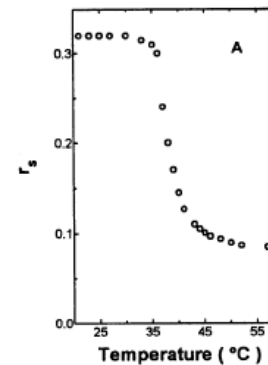
DPPC: dipalmitoil foszfatidilkolin

Fluorofór: DPH

DPH: difenil hexatrién



A fázisátalakulási hőmérséklet fölött jelentősen lecsökken a lipíd réteg mikroviszkózítása.



34

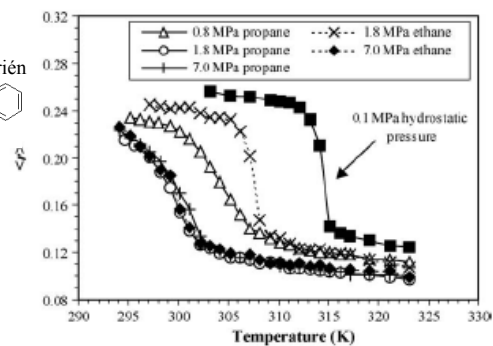
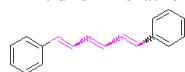
Alkánok és nyomás hatása a liposzóma mikroviszkózítására:

Liposzóma: DPPC

DPPC: dipalmitoil foszfatidilkolin

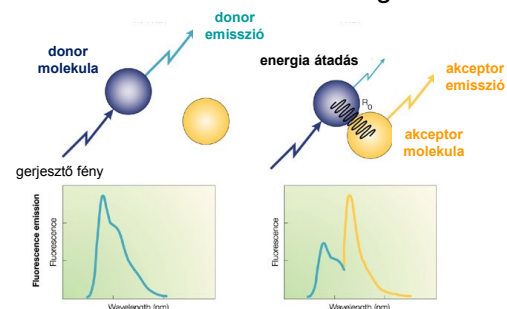
Fluorofór: DPH

DPH: difenil hexatrién



35

Förster-féle rezonancia energiatranszfer (FRET)



Mért mennyiség: donor/akceptor intenzitásarány

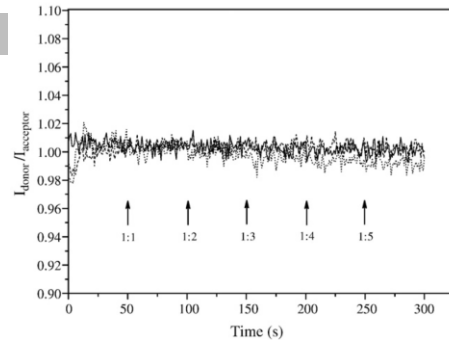
Nagyon erősen függ a távolságtól!

➔ „molekuláris mérőszalag”

36

Példa: nem-szteroid gyulladásgátlók (ibuprofen, diklofenak, naproxen) hatása a membránra (folytatás)

FRET



→ nincs változás

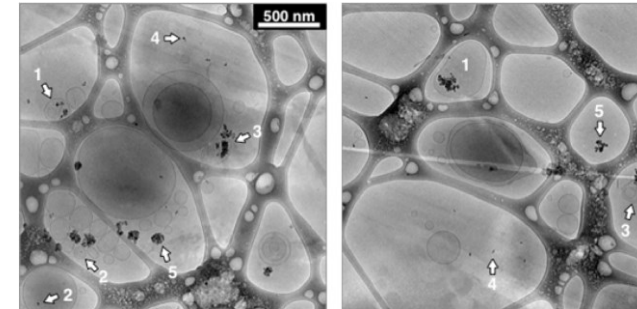
→ A vizsgált molekulák nem hatolnak be a lipid molekulák közé.

37

Magnetoliposzómák

Liposzóma: DPPC+koleszterin

Mágnes: Fe_3O_4 nanorészecskék



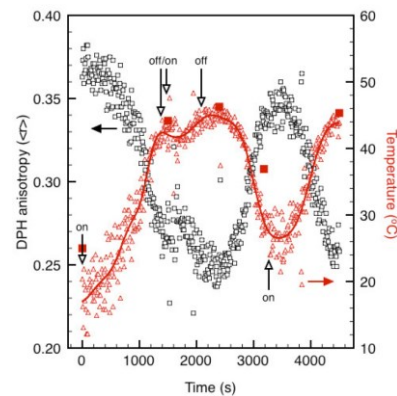
(TEM felvételek)

38

Melegítés rádióhullámokkal

$f = 281 \text{ kHz}$

Fluorofór: DPH



39

Példa: hőmérséklettel aktivált liposzóma tervezése



BASIC SCIENCE

Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine
10 (2014) 1243–1252



nanomedjournal.com

Original Article

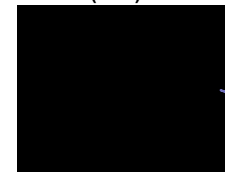
Principles of rational design of thermally targeted liposomes for local drug delivery

Roberto Tejera-Garcia, PhD¹, Petteri Parkkila, BSc¹,
Vladimir Zamotin, PhD, Paavo K.J. Kinnunen, PhD*

¹Helsinki Biophysics and Biomembrane Group, Department of Biomedical Engineering and Computational Science, School of Sciences, Aalto University, Espoo, Finland

Received 7 January 2014; accepted 20 March 2014

Doxorubicin (Dox)



citosztatikum, a szokásos mellékhatásokkal

→ Céltűzés: liposzómás bejuttatás, de úgy, hogy az egészséges szövetben minél kevesebb, a daganatban minél több hatóanyag jelenjen meg.

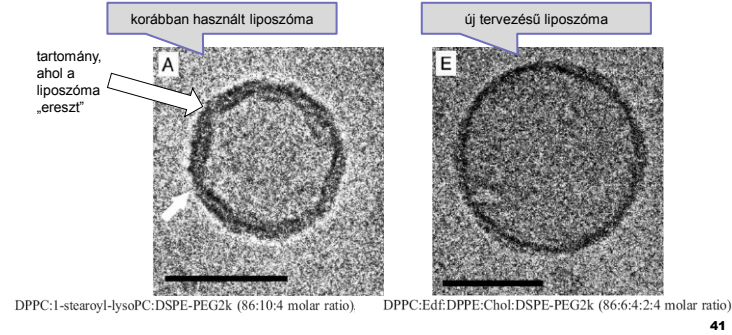
Van saját fluoreszcenciája

40

Elv:

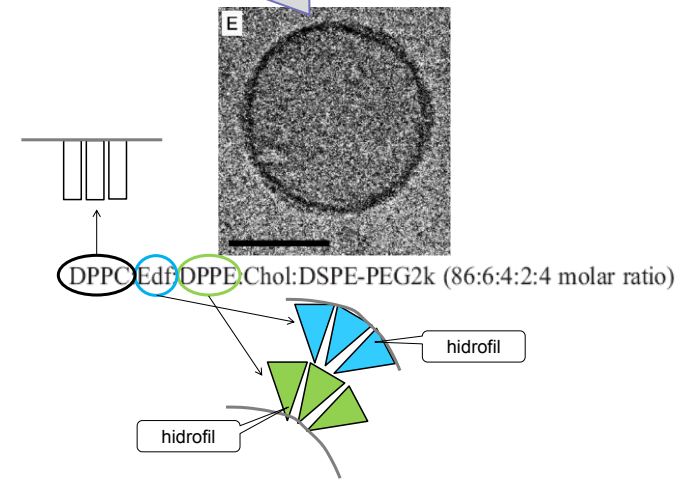
1. Daganat lokális felmelegítése 39–41°C-ra (T_R), pl. MRlgHIFU technikával
2. Hatóanyag bezárása olyan liposzómába melynek,
 - a) gél→fluid átmeneti hőmérséklete T_R közelében van,
 - b) hatóanyag kieresztése T_R alatt minél kisebb, T_R közelében minél nagyobb.

Liposzóma tervezése:



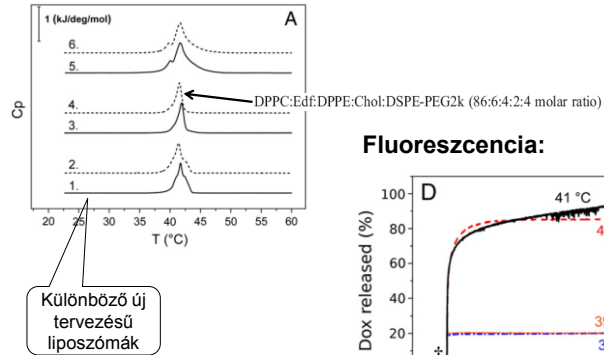
41

új tervezésű liposzóma

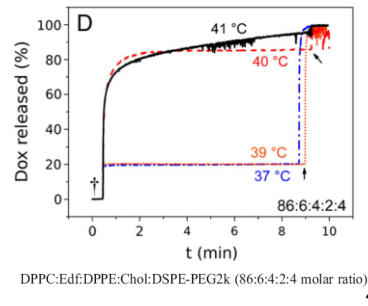


42

DSC:

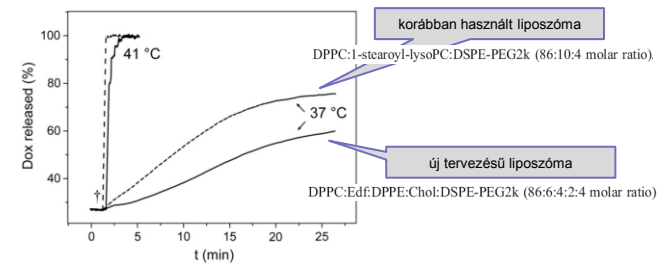


Fluoreszcencia:



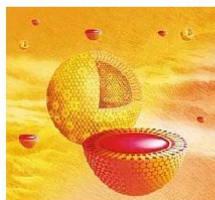
43

Fluoreszcencia:



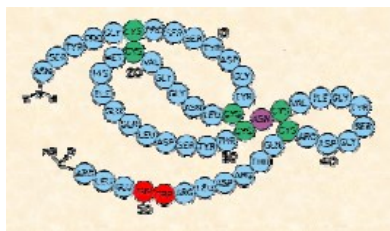
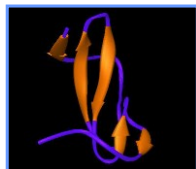
44

Liposzómák orvosi és gyógyszerési felhasználása



Ifjú András (FOK III. évf.)
Korányi Frigyes Szakkollégium
Témavezető: Tolgyesi Ferenc
Egyetemi adjunktus
Semmelweis Egyetem
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

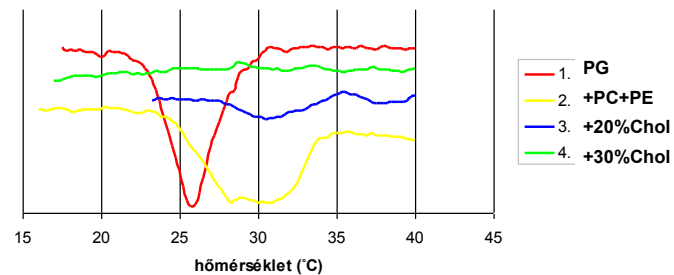
epidermális növekedési faktor (EGF)



45

Epithelsejteket modellező liposzóma:

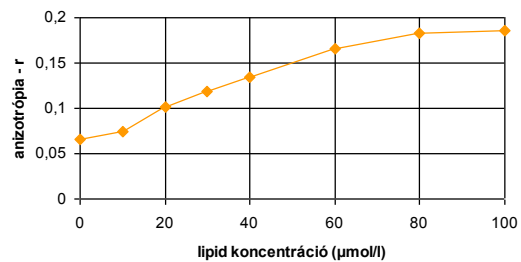
DSC termogram



46

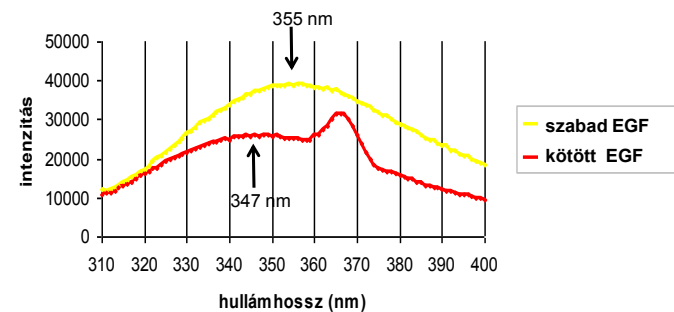
EGF kötődése

steady-state anizotrópia mérések



47

EGF emissziós spektruma



48