

## Kalorimetriás módszerek a liposzómák vizsgálatában

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

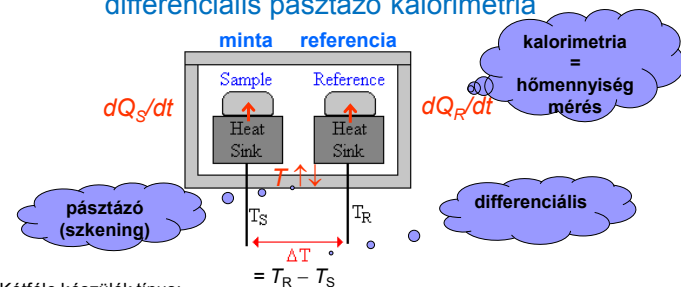
1

## DSC : differential scanning calorimetry



2

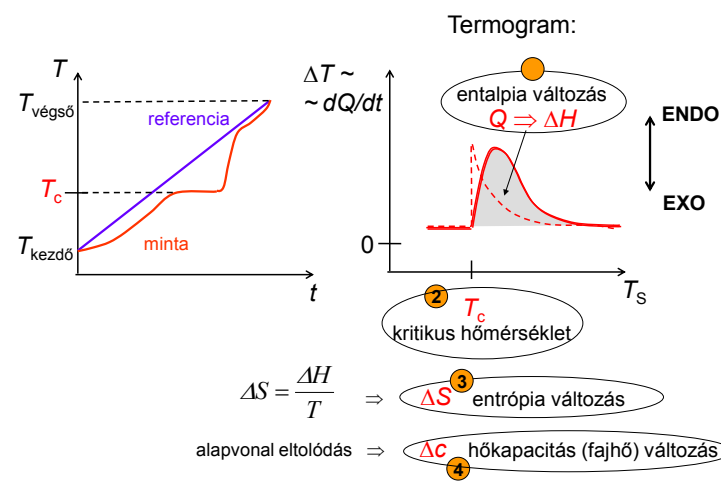
## DSC: differential scanning calorimetry differenciális pásztázó kalorimetria



Kétféle készülék típus:

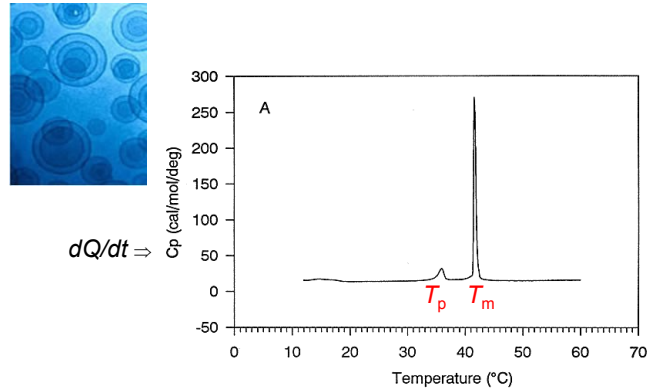
- 1 mért mennyiség:  $\Delta T \Rightarrow$  fűtőtéljesítmény szabályozása, hogy  $\Delta T = 0$  legyen  $\Rightarrow$  mért mennyiség:  $dQ_S/dt - dQ_R/dt = dQ/dt$
- 2 mért mennyiség:  $\Delta T \Rightarrow$  számolás:  $dQ/dt$

3

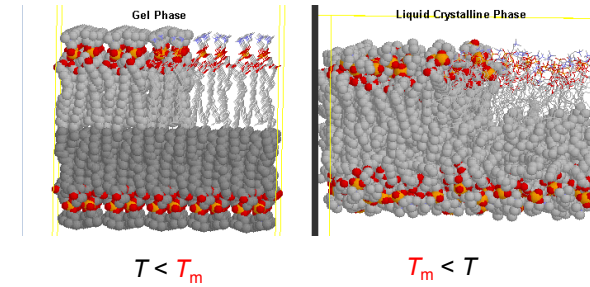


4

## Példa: DPPC multilamelláris liposzóma



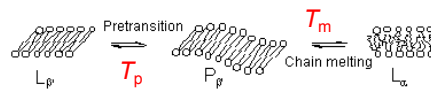
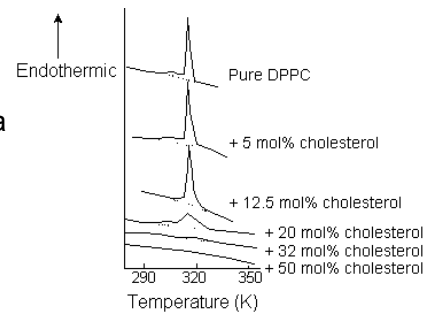
5



6

## Példa:

koleszterin hatása  
DPPC liposzóma  
termogramjára

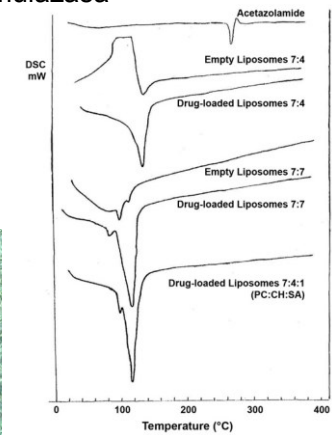
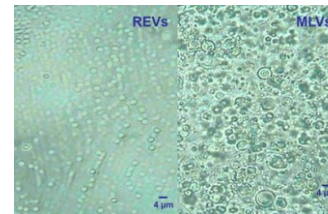


7

## 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)



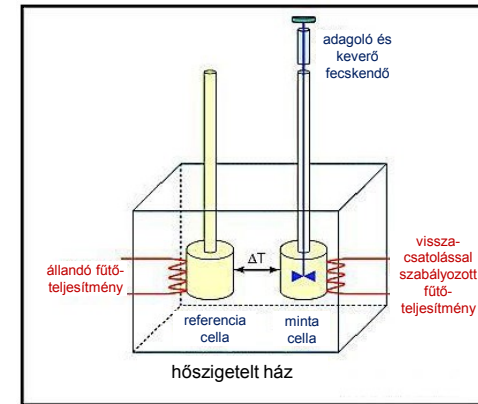
8

ITC: isotherm titration calorimetry  
izoterm titrációs kalorimetria



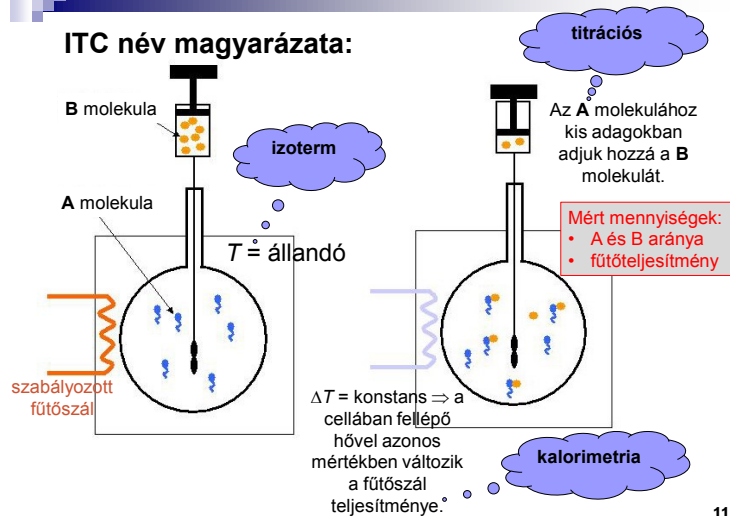
9

Felépítés:

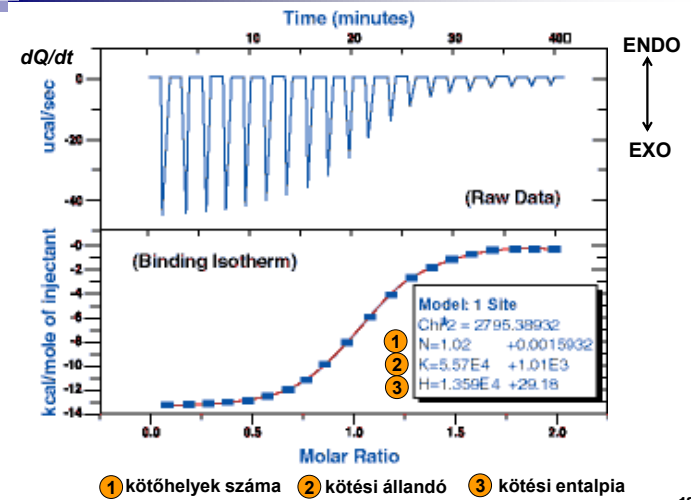


10

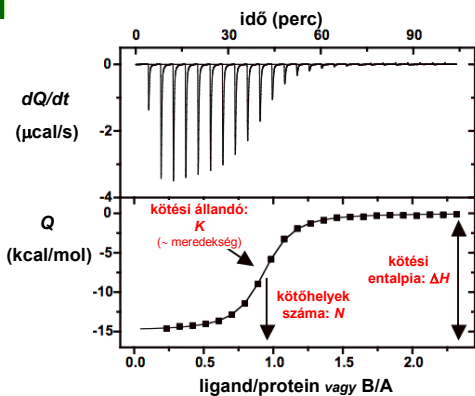
ITC név magyarázata:



11



12



13

Meghatározható mennyiségek:

$N, K, \Delta H$  +

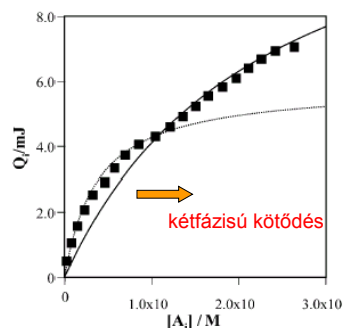
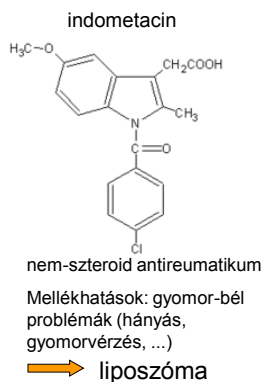
$$\left. \begin{aligned} \Delta G &= -RT \ln K \\ \Delta G &= \Delta H - T \cdot \Delta S \end{aligned} \right\} \text{4 } \Delta S \text{ kötési entropia}$$

**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

14

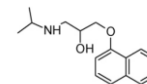
Példa: fájdalomcsillapító és liposzóma kölcsönhatása



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

15

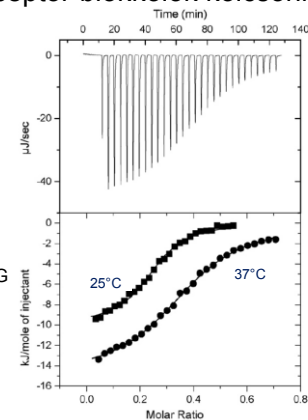
Példa: Béta-receptor blokkolók kölcsönhatása liposzómával



Propranolol

+

Liposzóma: POPC+POPG



Vizsgálták:

- ✧ 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

16

Liposzóma: DMPC



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

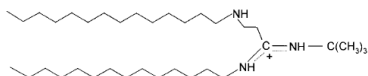
→ kölcsönhatás

17

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.

## Biophysical and Structural Properties of DNA·dC<sub>14</sub>-amidine Complexes

19

Figure 1 consists of two panels, A and B, each showing ITC titration curves and binding isotherms. Panel A shows the titration of Naproxen with HEPES, with the x-axis representing the molar ratio [Naproxen]/[Hepes] from 0.00 to 0.04 and the y-axis representing the change in enthalpy  $\Delta H$  (kJ/mole of injectant) from -2 to 0. The top plot shows the raw ITC data with power in  $\mu$ J/s on the y-axis and time in minutes on the x-axis. The bottom plot shows the integrated heat of injection per injection as a function of the molar ratio, with data points as black squares and a red line representing the fit. Panel B shows the titration of Naproxen with DMPC, with the x-axis representing the molar ratio [Naproxen]/[DMPC] from 0.0 to 3.0 and the y-axis representing  $\Delta H$  (kJ/mole of injectant) from -4 to 0. The top plot shows the raw ITC data with power in  $\mu$ J/s on the y-axis and time in minutes on the x-axis. The bottom plot shows the integrated heat of injection per injection as a function of the molar ratio, with data points as black squares and a red line representing the fit.

➡ nincs kölcsönhatás

→ fluorescencja  
spektroskopia

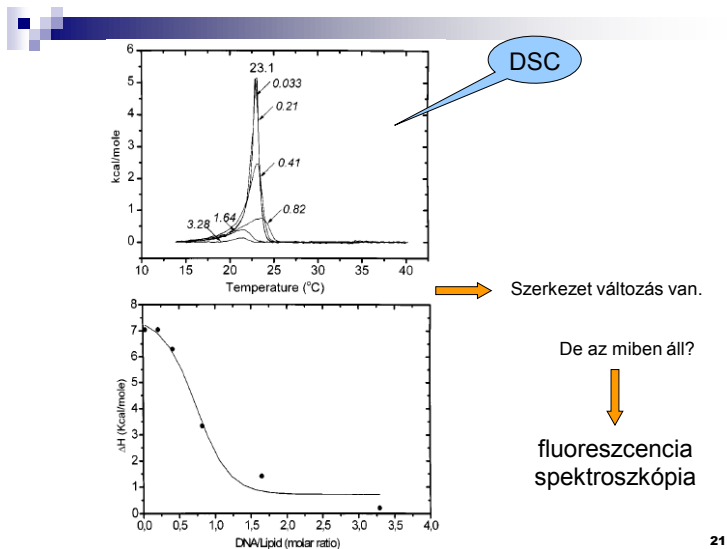
18

Figure 1 consists of two panels. The top panel is a plot of heat rate (μcal/sec) versus time (min). It shows a series of sharp endothermic peaks (downward) that decrease in magnitude over time, indicating the binding of BPG to the DNA. An inset shows a zoomed-in view of the peaks. The bottom panel is a plot of integrated heat (kcal/mole of injectant) versus molar ratio (DNA/Lipid). The data points (black circles) show a sigmoidal binding curve with a maximum at a molar ratio of approximately 0.5. A dashed horizontal line is drawn at zero. Red arrows point from the text '1:1 stoichiometry' to the maximum of the binding curve.

- liposzóma átrendeződés ?

kötődés

20



21

## Fluoreszcenciás módszerek a liposzómák vizsgálatában

The figure shows four fluorescence microscopy images of liposomes. The top-left image shows green fluorescence. The top-right image shows a blue fluorescence. The bottom-left image shows a red fluorescence. The bottom-right image shows a blue fluorescence. The images are arranged in a 2x2 grid.

22

## Fluoreszcencia

fluoreszcencia → lumineszcencia

**Lumineszcencia:** hőmérsékleti sugárzáson felüli többlet sugárzás.

**Megfigyelések:**

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

The figure shows two images. The left image is a spectrum of light with several distinct colored lines (red, orange, yellow, green, blue, purple). The right image is a photograph of a jellyfish, which is glowing with a yellowish light.

23

Gerjesztés szerint:

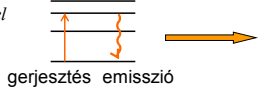
gerjesztés módja	elnevezés	példa
fény	fotolumineszcencia (fluoreszcencia)	kinin-szulfát, foszfor, ...
röntgensugárzás.	röntgenolumin.	NaI (TI)
radioaktív sugárzás.	radiolumin.	NaI (TI)
elektromos tér	elektrolumin.	higanygőzlámpa
mechanikai hatás	tribolumin.	kockacukor
kémiai reakció	kemolumin. (biolumin.)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

The figure shows several images of luminescent objects. On the left, there are two bottles of liquid, one labeled 'LUMINO' and the other 'LUMINO'. In the center, there are two blue cylindrical objects. On the right, there are several small vials and a larger bottle. Below these, there are images of a hand holding a glowing object, a glowing object in a container, and a glowing object in a container. At the bottom, there are images of a glowing beetle and a glowing object.

24

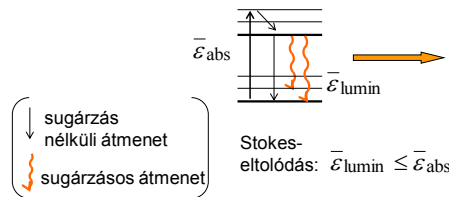
## Lumineszcencia mechanizmusa

**atom:**  $E = E_{el}$



vonalas spektrum  
(pl. Na)

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



vonalas/sávos spektrum  
(pl. fluoreszcein)

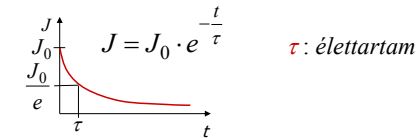
Stokes-eltolódás:  $\bar{\epsilon}_{lumin} \leq \bar{\epsilon}_{abs}$

↓ sugárzás nélküli átmenet  
↓ sugárzásos átmenet

25

## Lumineszcenciafény jellemzése

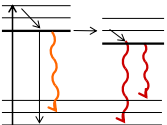
- vonalak, sávok helyzete, alakja, intenzitása
- Stokes-féle eltolódás  $[\bar{\epsilon}_{lumin} \leq \bar{\epsilon}_{abs}]$
- kvantumhatásfok:  $Q = \text{emittált fotonok száma} / \text{abszorbeált fotonok száma} (< 1)$
- élettartam:



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

26

## Fluoreszcencia és foszforeszcencia



gerjesztés

← metastabil állapot  
← kis valószínűségű átmenet

**fluoreszcencia foszforeszcencia**

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

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

$$\tau_{fluo} \ll \tau_{phos}$$

pl. triptofán:

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

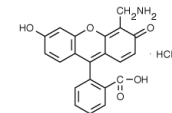
$$\bar{\lambda}_{phos} = 440 \text{ nm}$$

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

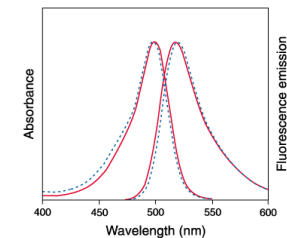
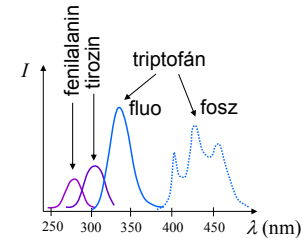
$$\tau_{phos} = 0,001 - 5 \text{ s}$$

27

Példák:

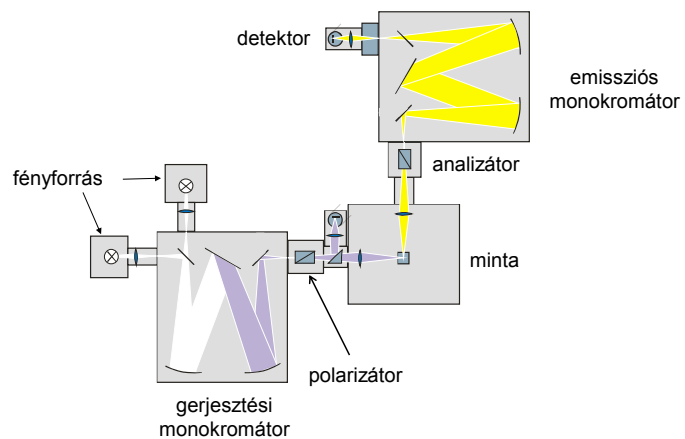


fluoreszcein



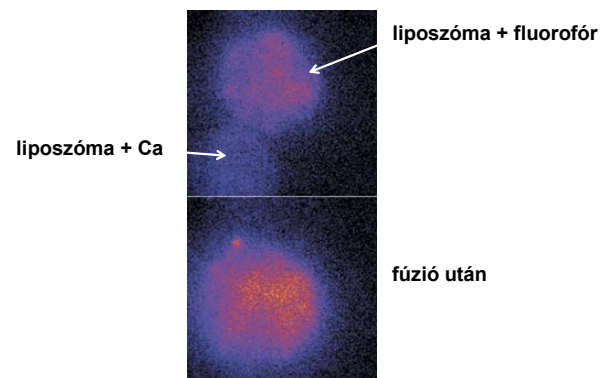
28

## Mérés – luminométer felépítése



29

## Példák:



30

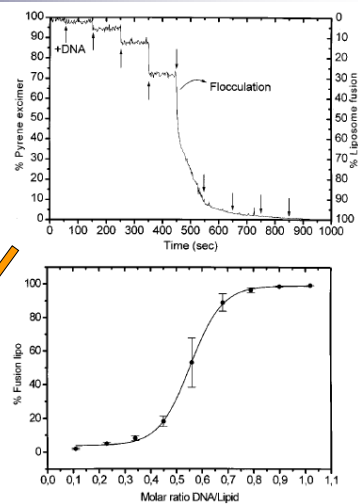
## DNS és liposzóma kölcsönhatása (folyt.):

Fluorofór: pirén

Pirén excimer (~ koncentráció):

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

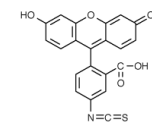
pirén fluoreszcenciája csökken  $\Rightarrow$  fúzió



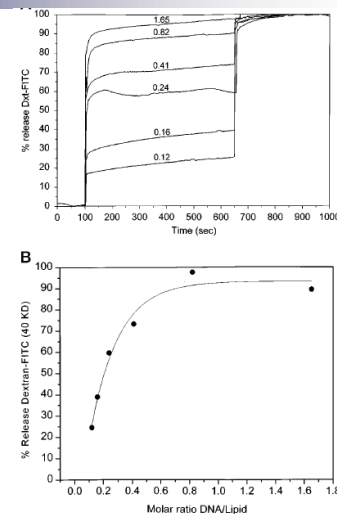
31

Fluorofór:  
FITC-vel jelzett dextrán

(FITC: fluoreszcein-izotiocianát)



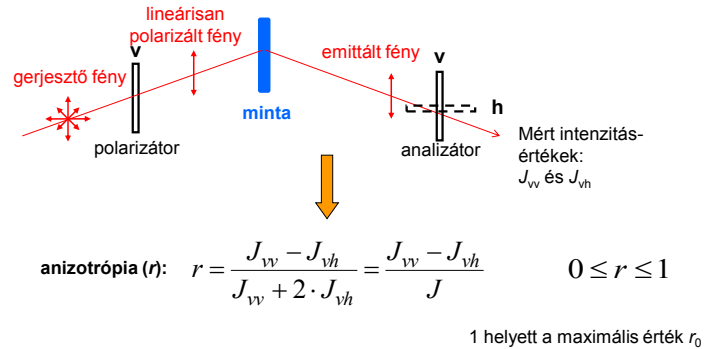
DNS destabilizálja a liposzómákat  $\Rightarrow$  dextrán kiáramlás, fúzió



32



## Anizotrópia mérése



33

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

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

$\eta$ : viszkozitás  
 $V$ : molekula(rész) térfogata  
 $k$ : Boltzmann-állandó  
 $T$ : hőmérséklet

$\eta$ : mikroviszkozitás  
 $(1/\eta)$ : mikrofluiditás

Az anizotrópia értékek átszámolhatók mikroviszkozításra.  
 Nagyobb anizotrópia nagyobb mikroviszkozitást jelent.

34

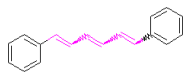
Liposzóma mikroviszkozitása a hőmérséklet függvényében:

**Liposzóma: DPPC**

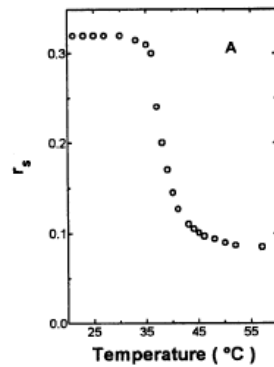
DPPC: dipalmitoil foszfátidilkolin

**Fluorofór: DPH**

DPH: difenil hexatrién



A fázisátalakulási hőmérséklet fölött jelentősen lecsökken a lipidréteg mikroviszkozitása.



35

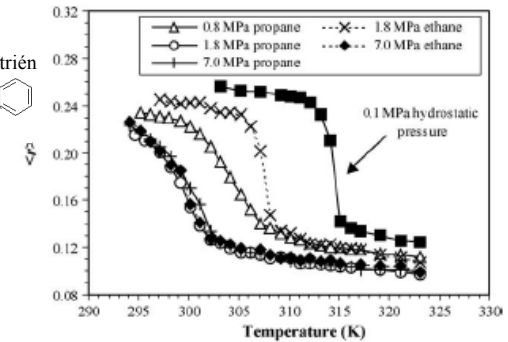
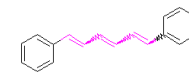
Alkánok és nyomás hatása a liposzóma mikroviszkozítására:

**Liposzóma: DPPC**

DPPC: dipalmitoil foszfátidilkolin

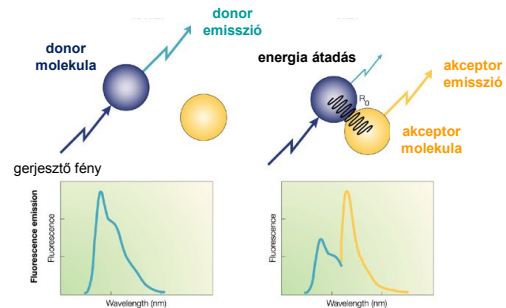
**Fluorofór: DPH**

DPH: difenil hexatrién



36

## Förster-féle rezonancia energiatranszfer (FRET)



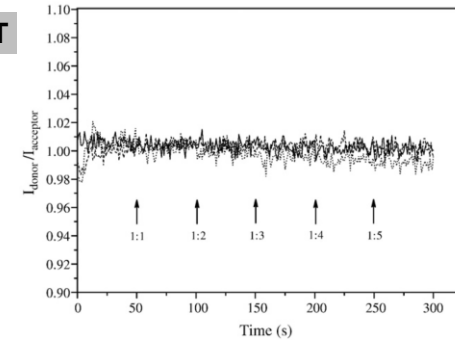
Mért mennyiség: donor/akceptor intenzitásarány

Nagyon erősen függ  
a távolságtól!  
→ „molekuláris  
mérőszalag”

37

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

FRET



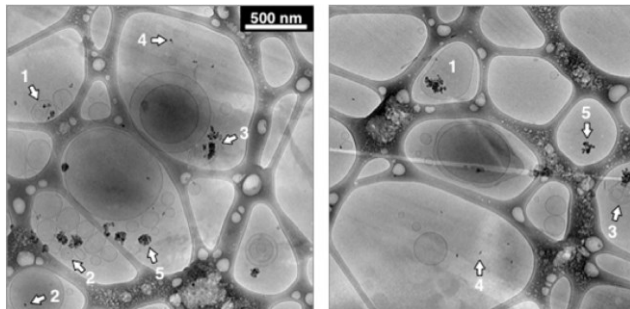
→ nincs változás

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

38

## Magnetoliposzómák

Liposzóma: DPPC+koleszterin  
Mágnes:  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanorészecskék

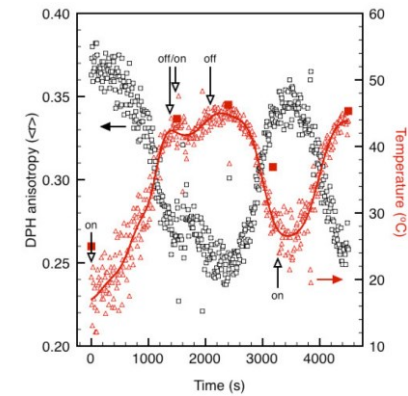


(TEM felvételek)

39

## Melegítés rádióhullámokkal

$f = 281 \text{ kHz}$   
Fluorofór: DPH



40

## Példa: hőmérséklettel aktivált liposzóma tervezése



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

Original Article



nanomedjournal.com

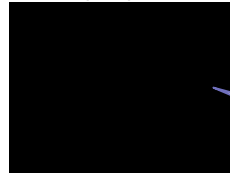
### Principles of rational design of thermally targeted liposomes for local drug delivery

Roberto Tejera-Garcia, PhD<sup>1</sup>, Petteri Parkkila, BSc<sup>1</sup>,  
Vladimir Zamotin, PhD, Paavo K.J. Kinnunen, PhD\*

*Helsinki 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)



citostaticum,  
a szokásos  
mellékhatásokkal



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

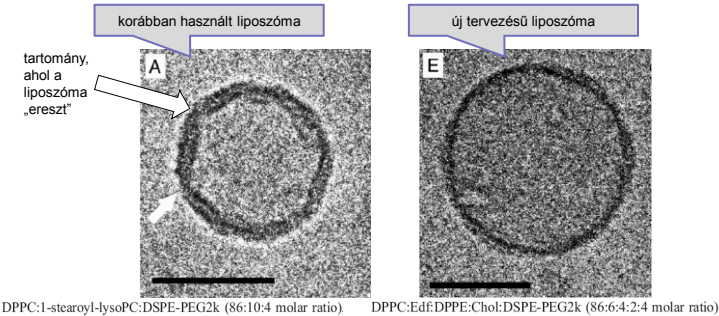
Van saját fluoreszcenciája

41

Elv:

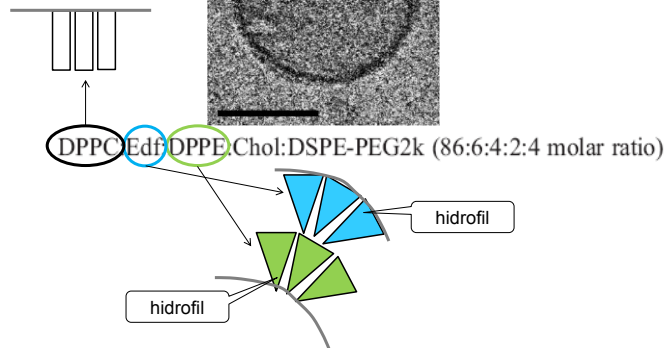
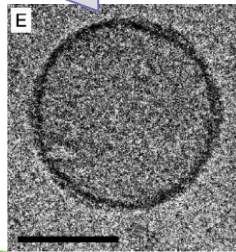
1. Daganat lokális felmelegítése 39–41°C-ra ( $T_R$ ), pl. MRlgHIFU technikával
2. Hatóanyag bezárása olyan liposzómába melynek,
  - a) gél→fluid átmeneti hőmérséklete  $T_R$  közelében van,
  - b) hatóanyag kieresztése  $T_R$  alatt minél kisebb,  $T_R$  közelében minél nagyobb.

### Liposzóma tervezése:



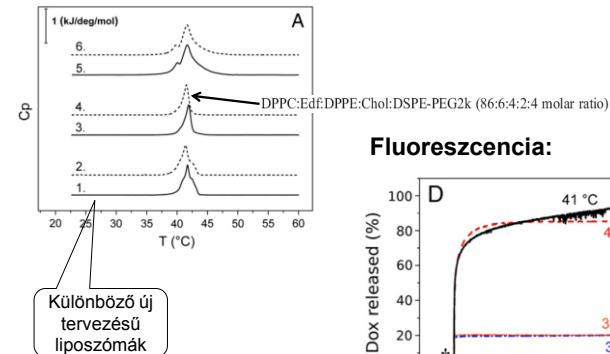
42

új tervezésű liposzóma

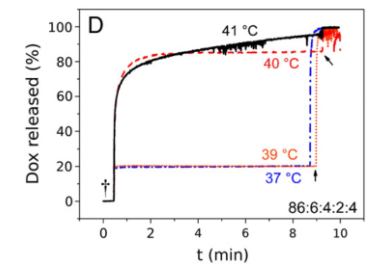


43

### DSC:



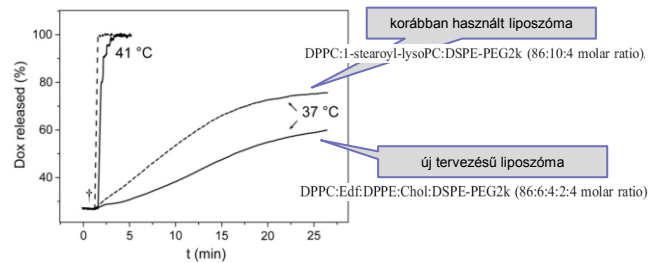
### Fluoreszcencia:



DPPC:Edf:DPPE:Chol:DSPE-PEG2k (86:6:4:2:4 molar ratio)

44

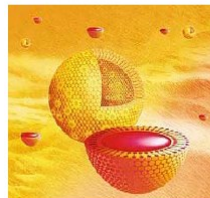
### Fluoreszcencia:



45

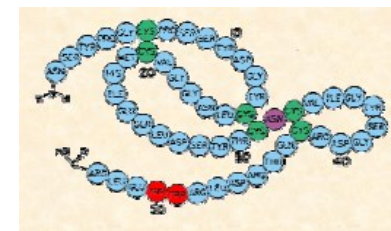
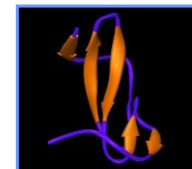
REKTORI PÁLYÁZAT

### Liposzómák orvosi és gyógyszerési felhasználása



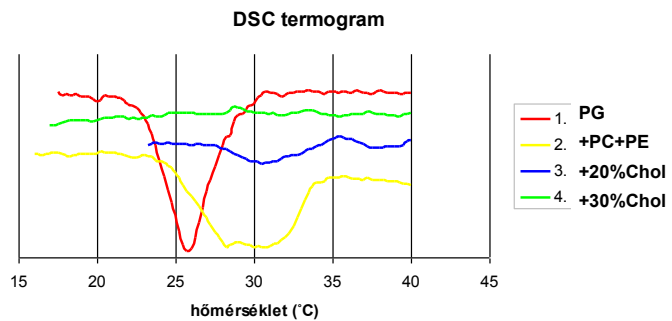
Iffó Andrák (FOK III évf.)  
Koranyi Frigyes Szakkollegium  
Témavezető: Tolgyesi Ferenc  
Egyetemi adjunktus  
Semmelweis Egyetem  
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

### epidermális növekedési faktor (EGF)



46

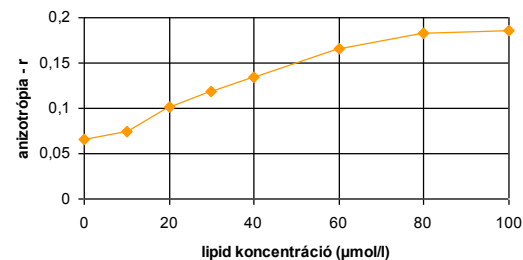
### Epithelsejteket modellező liposzóma:



47

### EGF kötődése

#### steady-state anizotrópia mérések



48

