

## Kalorimetriás módszerek a liposzómák vizsgálatában

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

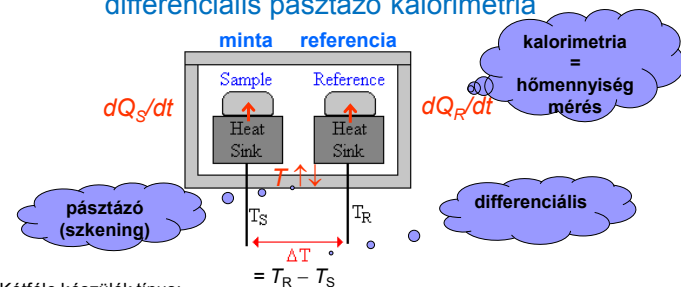
1

## DSC : differential scanning calorimetry



2

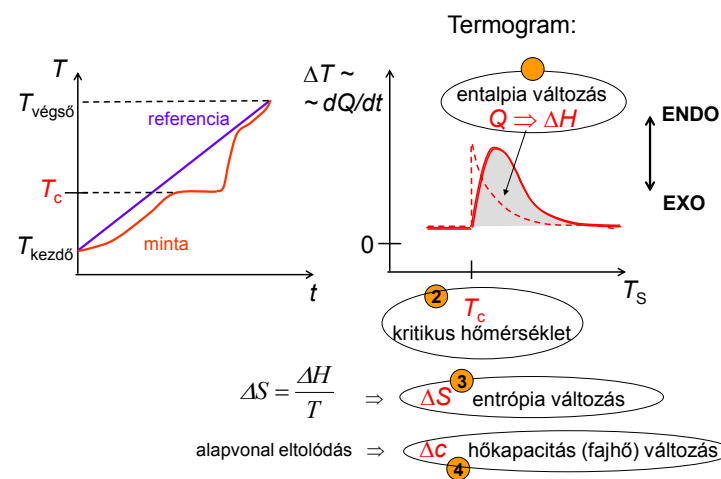
## DSC: differential scanning calorimetry differenciális pásztázó kalorimetria



Kétféle készülék típus:

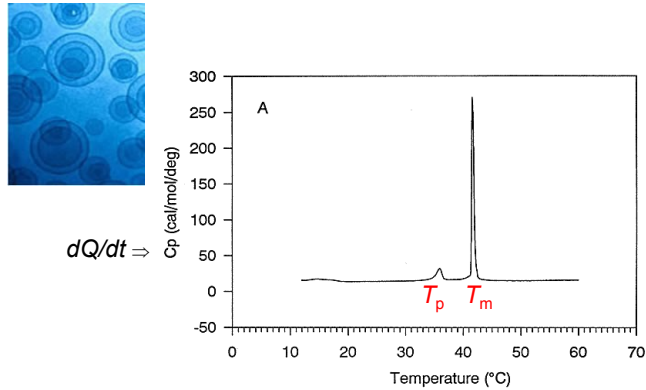
- 1 mért mennyiség:  $\Delta T \Rightarrow$  fűtőtéljesítmény szabályozása, hogy  $\Delta T = 0$  legyen  $\Rightarrow$  mért mennyiség:  $dQ_S/dt - dQ_R/dt = dQ/dt$
- 2 mért mennyiség:  $\Delta T \Rightarrow$  számolás:  $dQ/dt$

3

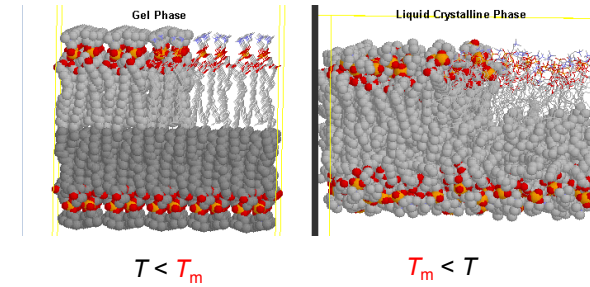


4

## Példa: DPPC multilamelláris liposzóma



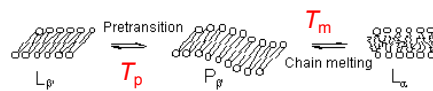
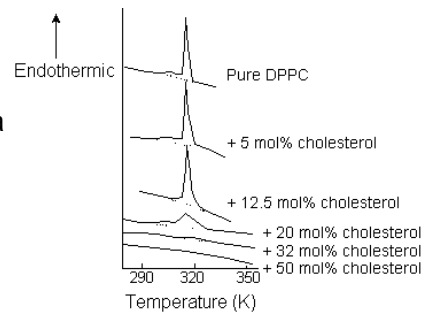
5



6

## Példa:

koleszterin hatása  
DPPC liposzóma  
termogramjára

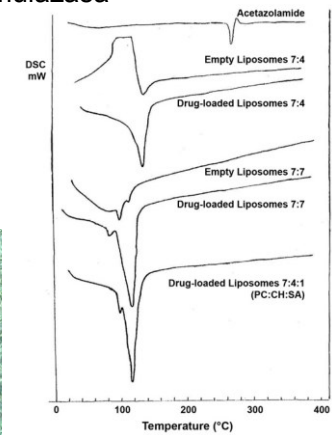
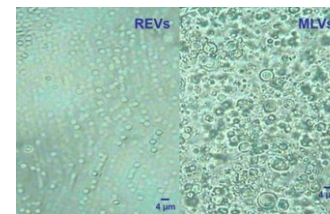


7

## 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)



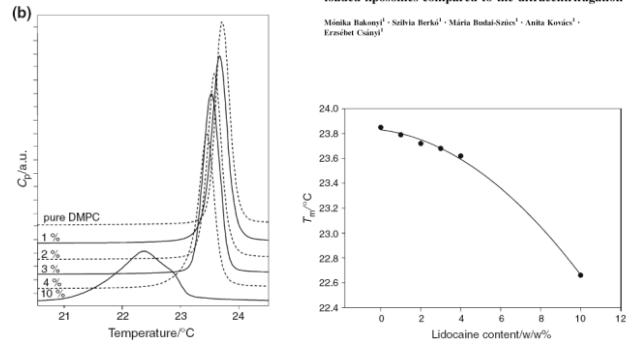
8

## Példa: Lidokain bezárása liposzómába

J Therm Anal Calorim (2017) 130:1619–1625  
DOI 10.1007/s10973-017-6394-1

DSC for evaluating the encapsulation efficiency of lidocaine-loaded liposomes compared to the ultracentrifugation method

Mónika Bakonyi<sup>1</sup> · Szilvia Berki<sup>1</sup> · Mária Budai-Szűcs<sup>1</sup> · Anikó Kovács<sup>1</sup> · Erzsébet Csányi<sup>1</sup>



DSC mérésekkel megbízhatóbban meg tudták határozni a lidokain bezáródási hatásfokát.

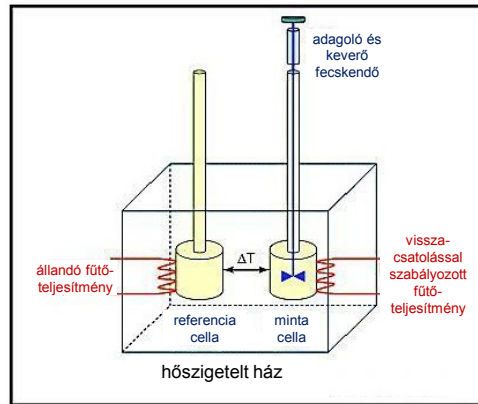
9

## ITC: isotherm titration calorimetry izoterm titrációs kalorimetria



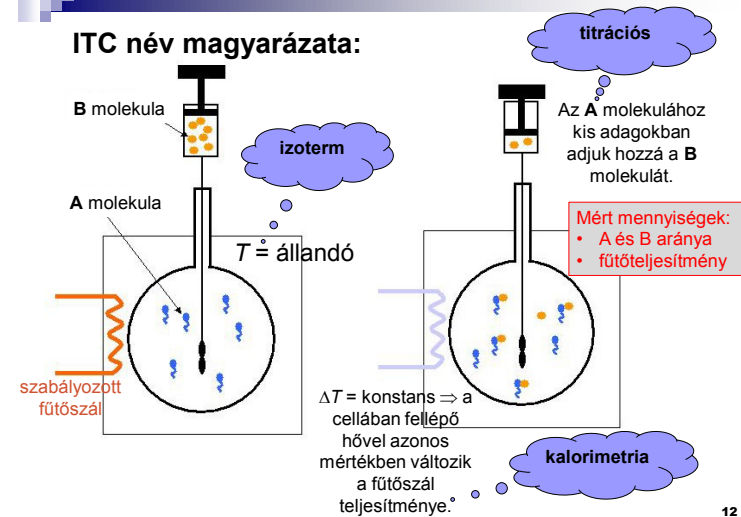
10

## Felépítés:

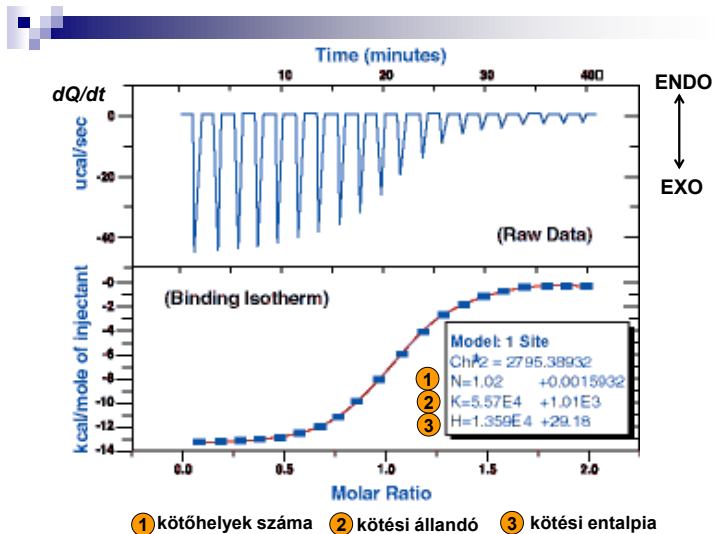


11

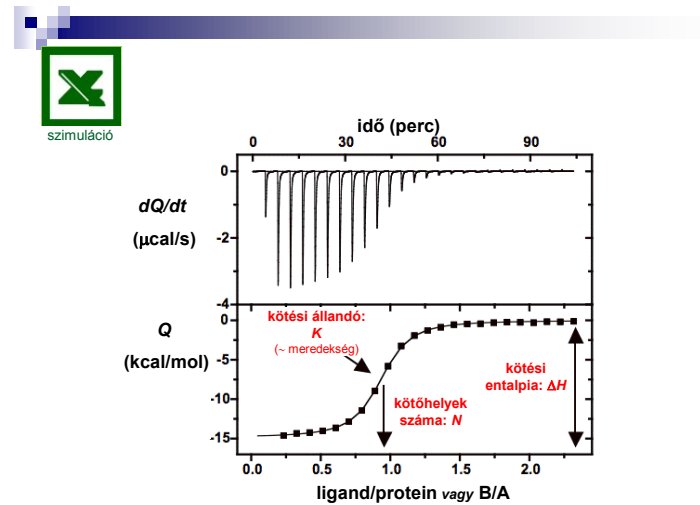
## ITC név magyarázata:



12



13



14

Meghatározható mennyiségek:

$N, K, \Delta H$  +

$$\Delta G = -RT \ln K$$

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

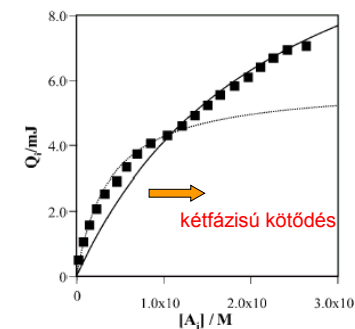
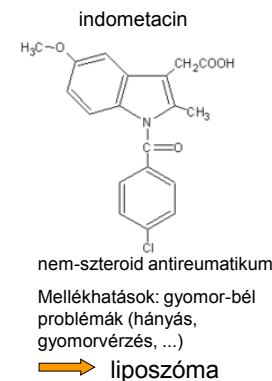
4  $\Delta S$  kötési entrópia

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

15

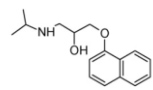
Példa: fájdalomcsillapító és liposzóma kölcsönhatása



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

16

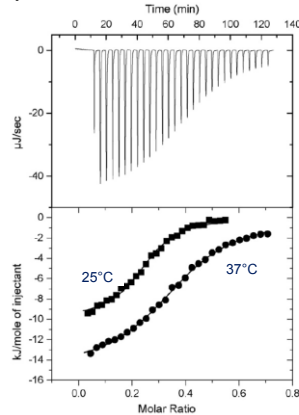
## Példa: Béta-receptor blokkolók kölcsönhatása liposzómával



Propranolol

+

Liposzóma: POPC+POPG



Vizsgálták:

- ◆ koncentráció
- ◆ ionerősség
- ◆ hőmérséklet
- ◆ liposzóma méret hatását.



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

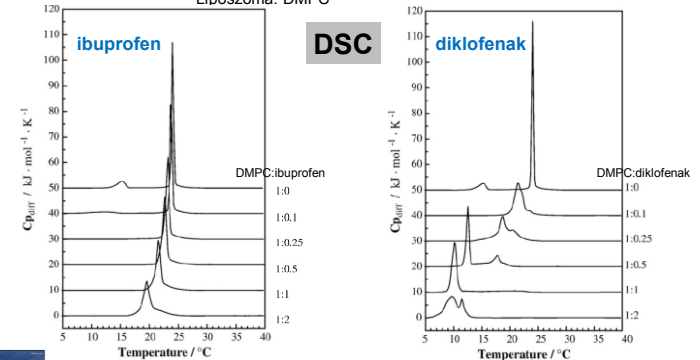
Microcalorimetric and zeta potential study on binding of drugs on liposomes

17

## Példa: nem-szteroid gyulladásgátlók hatása a membránra

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

Liposzóma: DMPC



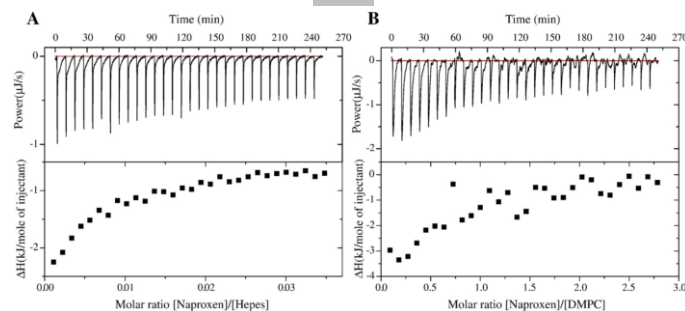
Biochimica et Biophysica Acta 1788 (2009) 1296–1303

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

→ kölcsönhatás

18

## ITC



→ nincs kölcsönhatás

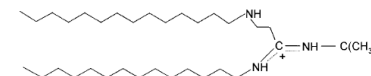
→ fluoreszcencia spektroszkópia

19

## Példa: DNS és liposzóma kölcsönhatása

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

Liposzóma: diC14-amidin



+ plazmid DNS

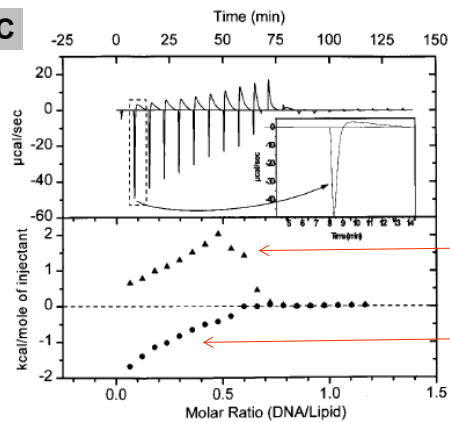
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY  
© 2000 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

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

Biophysical and Structural Properties of  
DNA-diC<sub>14</sub>-amidine Complexes

20

ITC

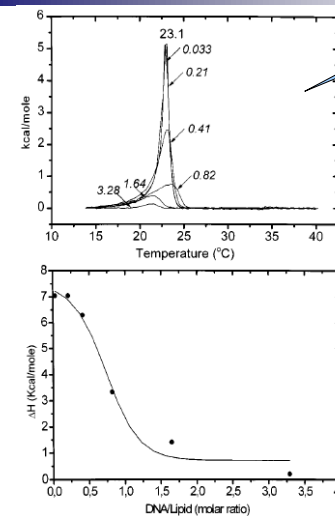


liposzóma  
átrendeződés ?

kötődés

21

DSC



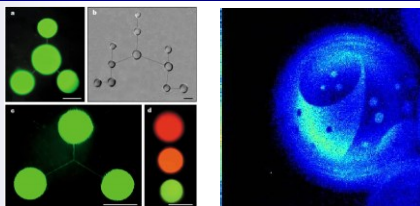
Szerkezet változás van.

De az miben áll?

fluoreszcencia  
spektroszkópia

22

## Fluoreszcenciás módszerek a liposzómák vizsgálatában



23

## Fluoreszcencia

fluoreszcencia  $\rightarrow$  lumineszcencia

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

### Megfigyelések:

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



24

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)

25

## Lumineszcencia mechanizmusa

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

gerjesztés emisszió

vonalas spektrum (pl. Na)

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

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

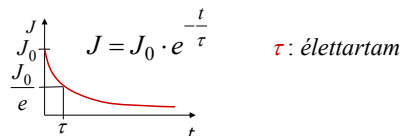
vonalas/sávos spektrum (pl. fluorescein)

sugárzás nélküli átmenet  
sugárzásos átmenet

26

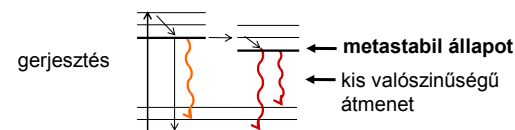
## Lumineszcenciafény jellemzése

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



27

## Fluoreszcencia és foszforeszcencia



fluoreszcencia foszforeszcencia

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

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

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

pl. triptofán:

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

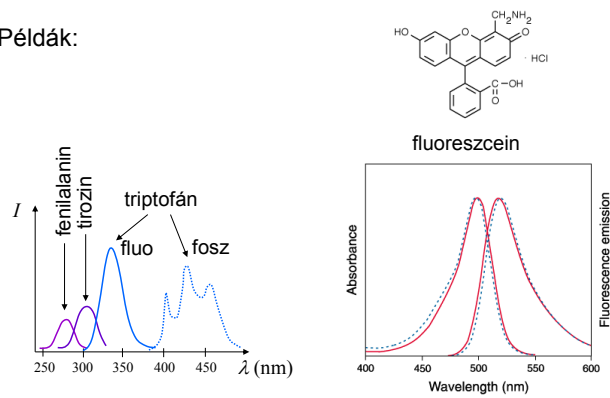
$$\bar{\lambda}_{phos} = 440 \text{ nm}$$

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

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

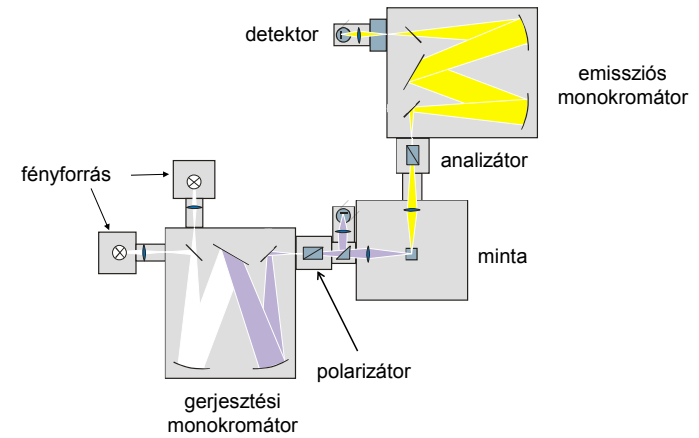
28

Példák:



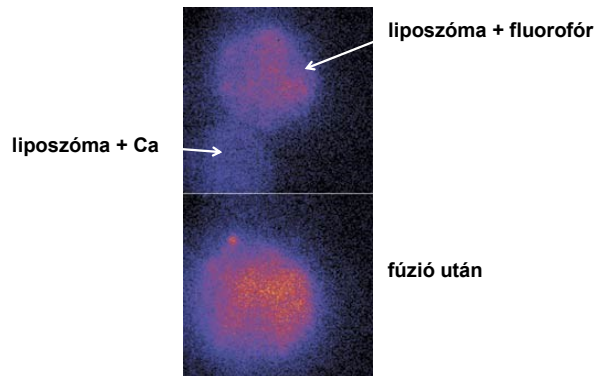
29

## Mérés – luminométer felépítése



30

Példák:



31

DNS és liposzóma  
köölcsönhatása  
(folyt.):

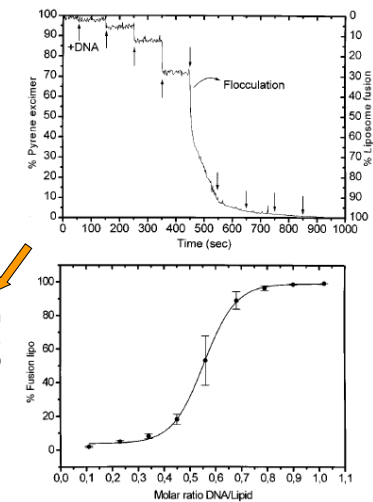
Fluorofór: pirén

Pirén excimer (~ koncentráció):

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



pirén  
fluoreszcenciája  
csökken  $\Rightarrow$  fúzió

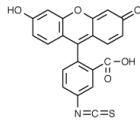


32

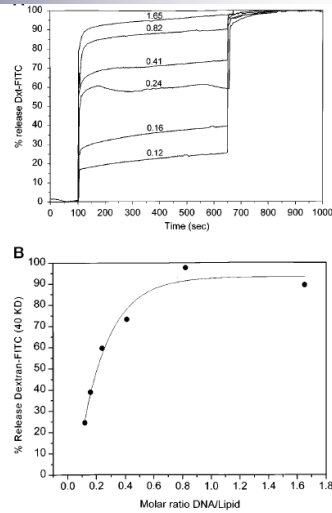


Fluorofór:  
FITC-vel jelzett dextrán

(FITC: fluoreszcein-izotiocianát)

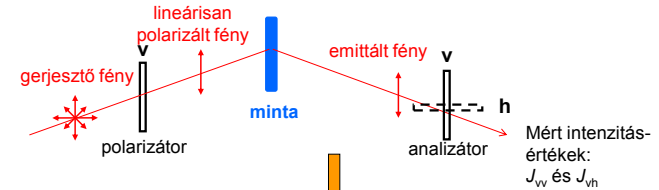


DNS destabilizálja a liposzómákat ⇒ dextrán kiáramlás, fúzió



33

## Anizotrópia mérése



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

1 helyett a maximális érték  $r_0$

34

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

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

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

35

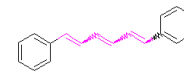
Liposzóma mikroviszkózitása a hőmérséklet függvényében:

Liposzóma: DPPC

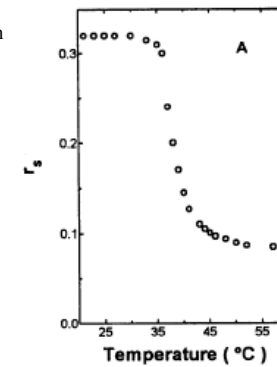
DPPC: dipalmitoil foszfatidilkolin

Fluorofór: DPH

DPH: difenil hexatrién



A fázisátalakulási hőmérséklet fölött jelentősen lecsökken a lipidréteg mikroviszkózitása.



36

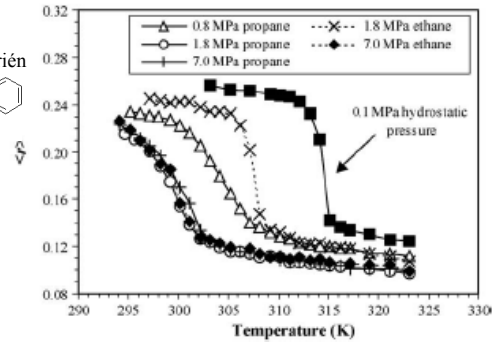
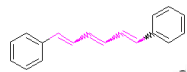
Alkánok és nyomás hatása a liposzóma mikroviszkózitására:

**Liposzóma: DPPC**

DPPC: dipalmitoil foszfatidilkolin

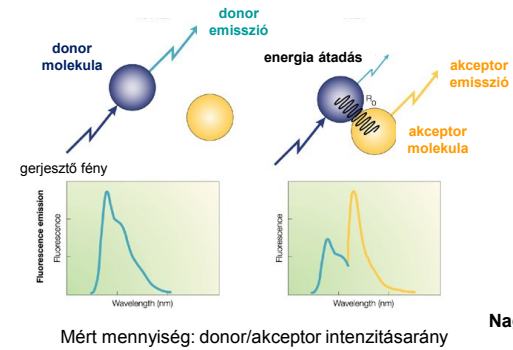
**Fluorofór: DPH**

DPH: difenil hexatrién



37

Förster-féle rezonancia energiatranszfer (FRET)

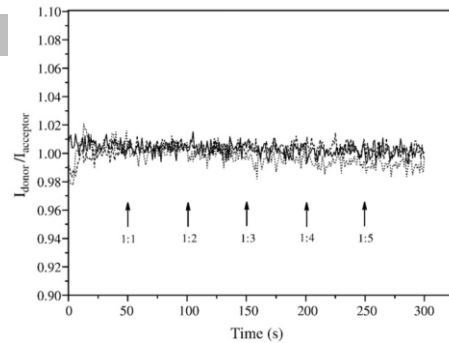


Nagyon erősen függ a távolságtól!  
 „molekuláris mérőszalag”

38

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

**FRET**



nincs változás

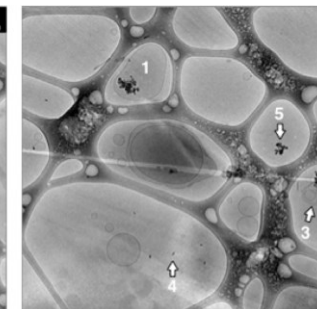
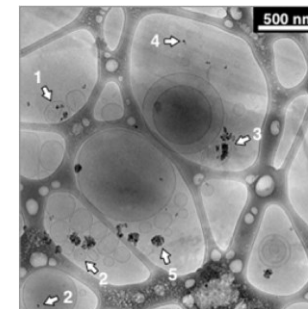
A vizsgált molekulák nem hatolnak be a lipid molekulák közé.

39

Magnetoliposzómák

**Liposzóma: DPPC+koleszterin**

**Mágnes: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanorészecskék**



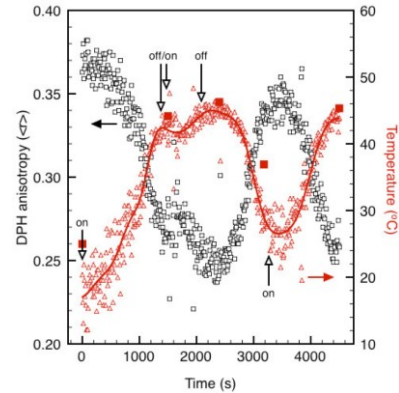
(TEM felvételek)

40

## Melegítés rádióhullámokkal

$f = 281 \text{ kHz}$

Fluorofór: DPH



41

## Példa: hőmérséklettel aktivált liposzóma tervezése



BASIC SCIENCE

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



nanomedjournal.com

Original Article

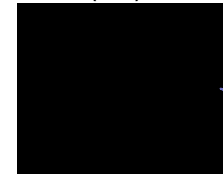
### Principles of rational design of thermally targeted liposomes for local drug delivery

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

<sup>1</sup>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)**



citosztatikum,  
a szokásos  
mellékhatásokkal

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

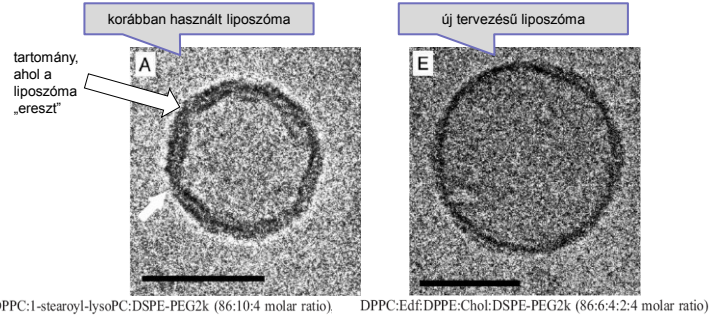
Van saját fluoreszcenciája

42

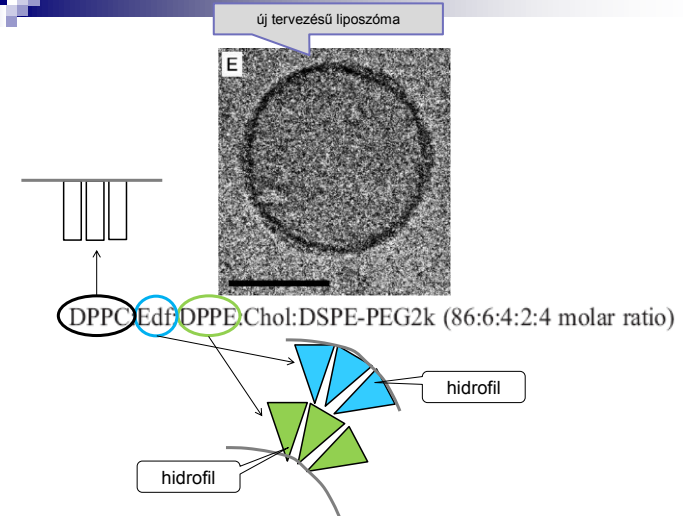
Elv:

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:



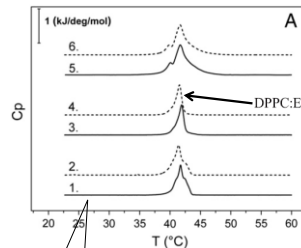
43



44

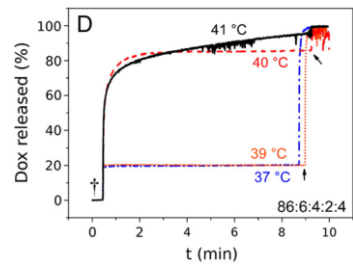


## DSC:



Különböző új tervezésű liposzómák

## Fluoreszcencia:

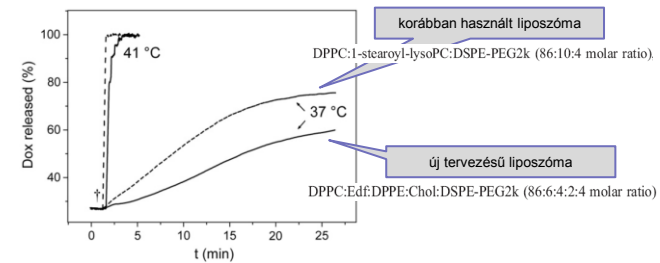


DPPC:Edf:DPPE:Chol:DSPE-PEG2k (86:6:4:2:4 molar ratio)

45



## Fluoreszcencia:



46