

Kalorimetriás módszerek a liposzómák vizsgálatában

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

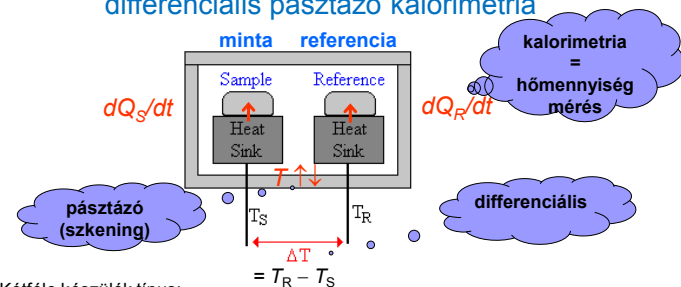
1

DSC : differential scanning calorimetry



2

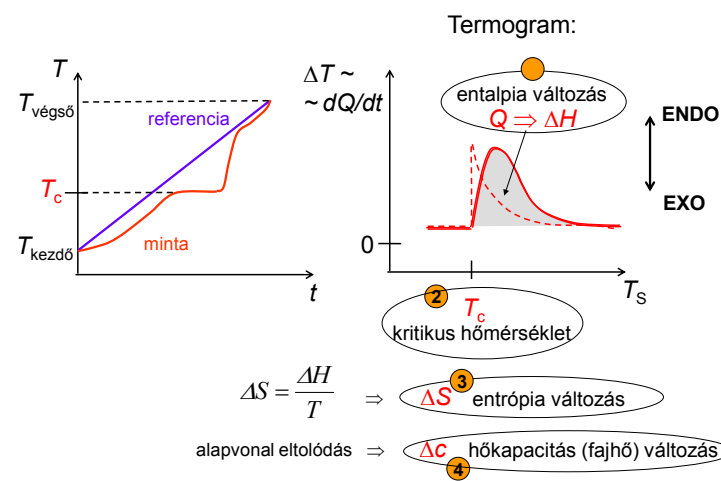
DSC: differential scanning calorimetry differenciális pásztázó kalorimetria



Kétféle készülék típus:

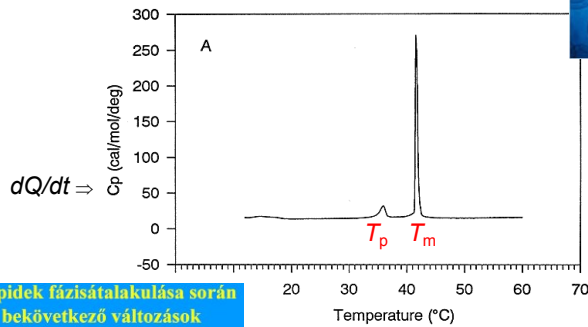
- 1 mért mennyiség: $\Delta T \Rightarrow$ fűtőtéljesítmény szabályozása, hogy $\Delta T = 0$ legyen \Rightarrow mért mennyiség: $dQ_S/dt - dQ_R/dt = dQ/dt$
- 2 mért mennyiség: $\Delta T \Rightarrow$ számolás: dQ/dt

3



4

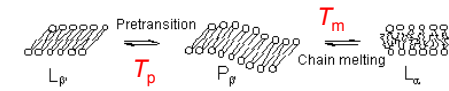
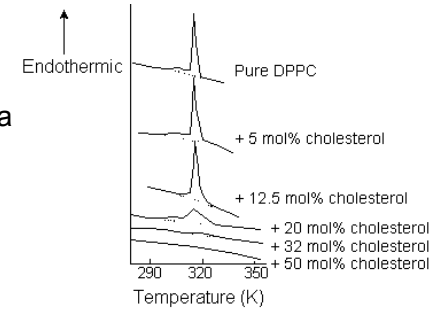
Példa: DPPC multilamelláris liposzóma



5

Példa:

koleszterin hatása DPPC liposzóma termogramjára

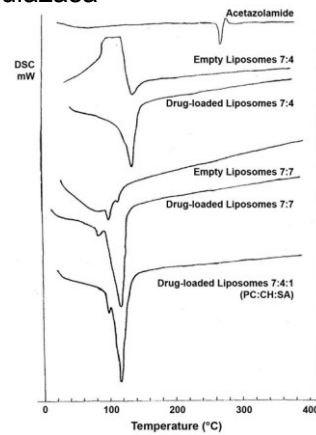
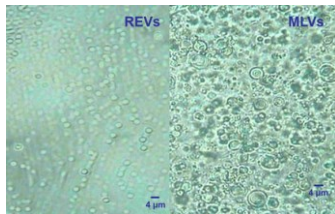


6

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)

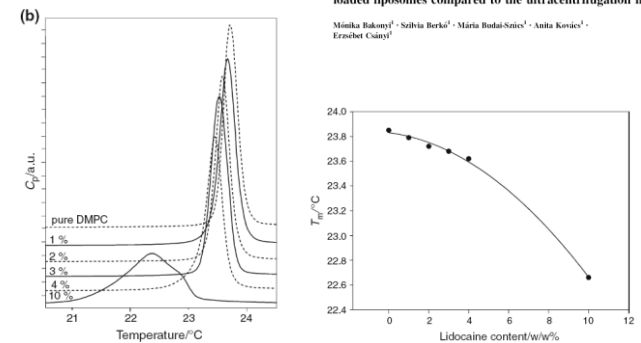


7

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
Miroslava Bakonyi¹, Sándor Berke², Mária Budai-Szűcs¹, Anita Kovács¹, Erzsébet Csányi¹



DSC mérésekkel megbízhatóbban meg tudták határozni a lidokain bezáródási határfokát.

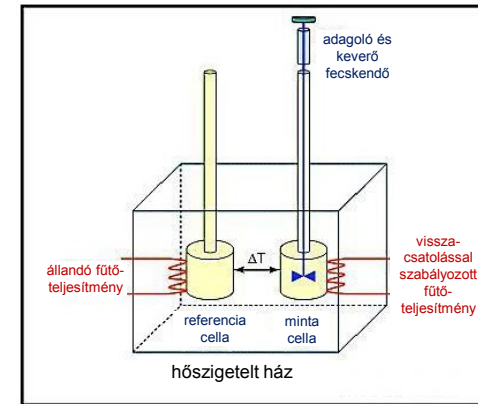
8

ITC: isotherm titration calorimetry
izoterm titrációs kalorimetria



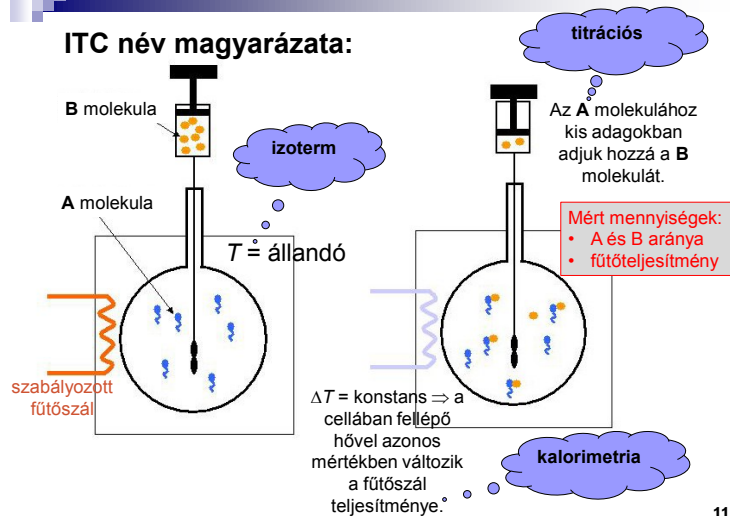
9

Felépítés:

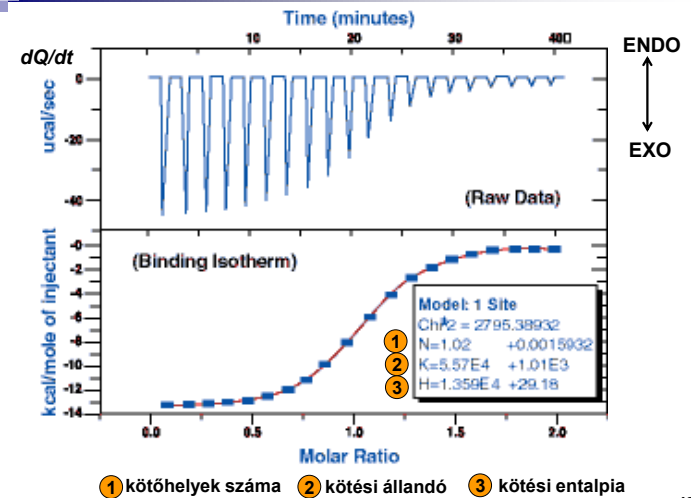


10

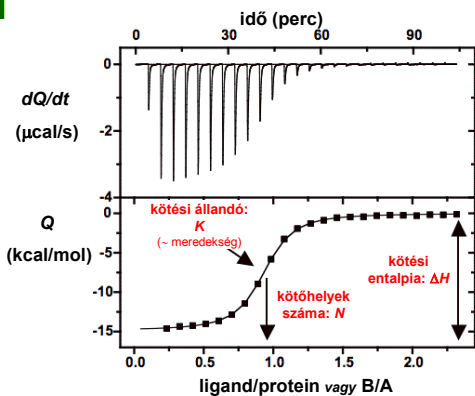
ITC név magyarázata:



11



12



13

Meghatározható mennyiségek:

$N, K, \Delta H$ +

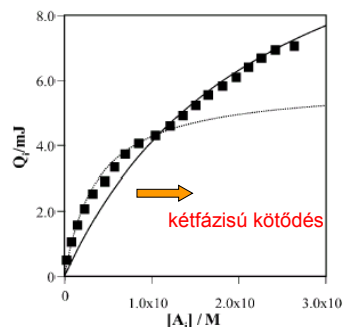
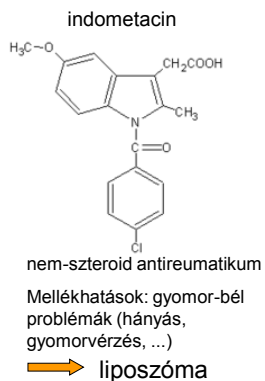
$$\left. \begin{aligned} \Delta G &= -RT \ln K \\ \Delta G &= \Delta H - T \cdot \Delta S \end{aligned} \right\} \text{4 } \Delta S \text{ kötési entropia}$$

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

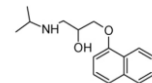
Példa: fájdalomcsillapító és liposzóma kölcsönhatása



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

15

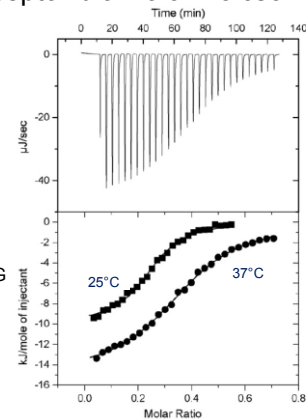
Példa: Béta-receptor blokkolók kölcsönhatása liposzómával



Propranolol

+

Liposzóma: POPC+POPG



Vizsgálták:

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



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

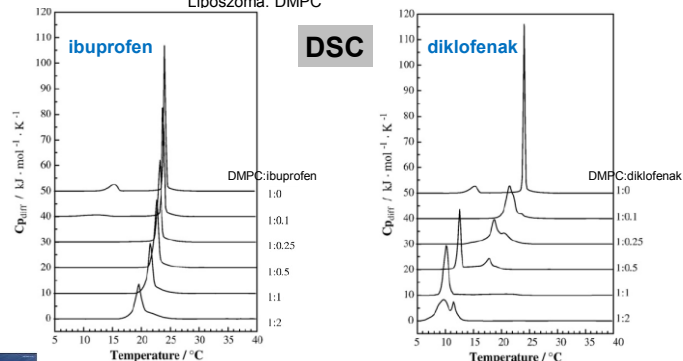
Microcalorimetric and zeta potential study on binding of drugs on liposomes

16

Példa: nem-szteroid gyulladásgátlók hatása a membránra

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

Liposzóma: DMPC



Biochimica et Biophysica Acta 1788 (2009) 1296–1303

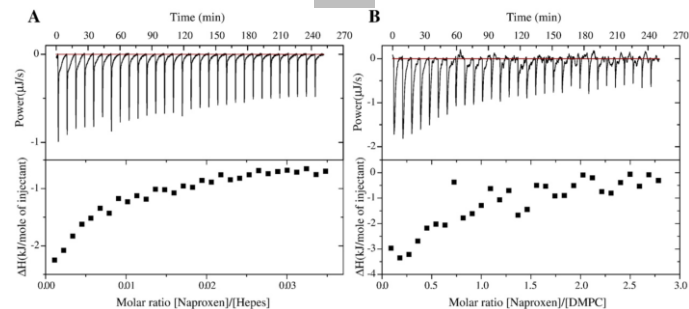
The membrane-activity of Ibuprofen, Diclofenac, and Naproxen: A physico-chemical study with lecithin phospholipids

→ kölcsönhatás

17

Naproxen?

ITC



→ DSC és ITC alapján nincs kölcsönhatás

Vagy mégis, csak nincs termikus jel?

→ fluoreszcencia spektroszkópia

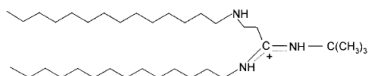
18

Példa: DNS és liposzóma kölcsönhatása

DNS transzfer → kationos liposzóma

előnyök: gyengébb immun válasz, nagy „méretválaszték”, sejt specifikus liposzómák, ...

Liposzóma: diC14-amidin



+ plazmid DNS

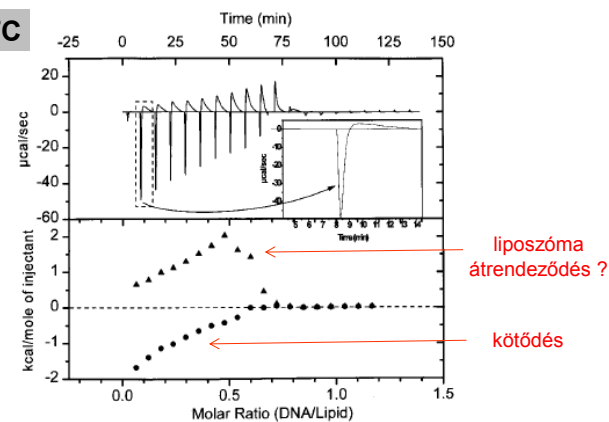
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
© 2000 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

Biophysical and Structural Properties of DNA-diC₁₄-amidine Complexes

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

19

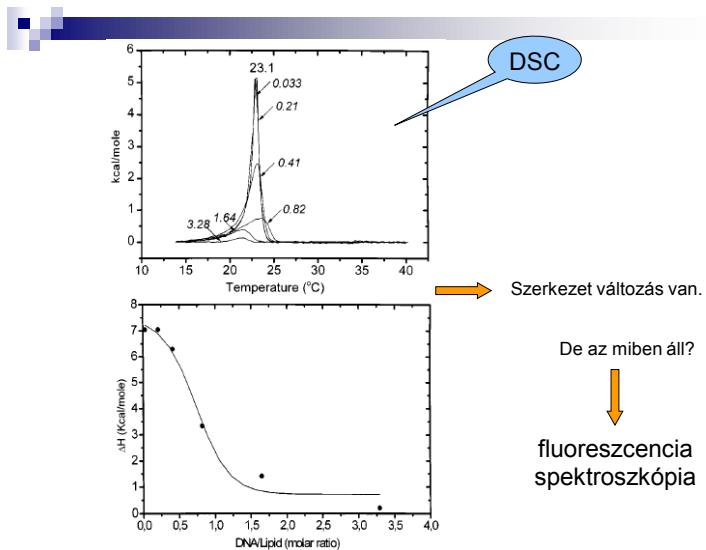
ITC



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 fluorescent liposomes. The top-right image shows a grayscale image of liposomes. The bottom-left image shows a cluster of green fluorescent liposomes. The bottom-right image shows a large, bright blue fluorescent liposome.

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 displays a series of vertical spectral lines in various colors (red, orange, yellow, green, blue, purple). The right image shows a jellyfish, likely a bioluminescent species, glowing with a yellowish light.

23

Gerjesztés szerint:

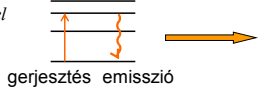
gerjesztés módja	elnevezés	példa
fény	fotolumineszcencia (fluoreszcencia)	kinin-szulfát, foszfor, ...
röntgensugárzás.	röntgenolumin.	NaI (TI)
radioaktív sugárzás.	radiolumin.	NaI (TI)
elektromos tér	elektrolumin.	higanygőzlámpa
mechanikai hatás	tribolumin.	kockacukor
kémiai reakció	kemolumin. (biolumin.)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

The figure shows several images related to luminescence. At the top, there are images of a bottle of 'Luminol' solution, a glowing blue liquid, and two glowing blue plastic cups. Below these, there are images of a glowing blue liquid in a test tube, a glowing blue liquid in a beaker, and a glowing blue liquid in a petri dish. At the bottom, there are images of a glowing blue liquid in a test tube, a glowing blue liquid in a beaker, and a glowing blue liquid in a petri dish.

24

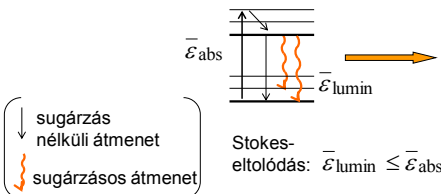
Lumineszcencia mechanizmusa

atom: $E = E_{el}$



vonalas spektrum
(pl. Na)

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



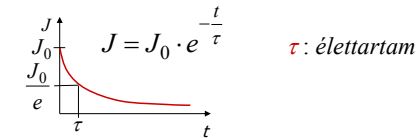
vonalas/sávos spektrum
(pl. fluoreszcein)

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

25

Lumineszcenciafény jellemzése

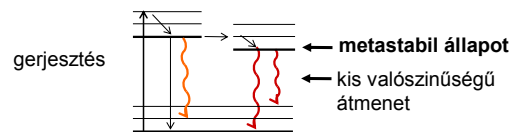
- vonalak, sávok helyzete, alakja, intenzitása
- Stokes-féle eltolódás $[\bar{\epsilon}_{lumin} \leq \bar{\epsilon}_{abs}]$
- kvantumhatásfok: $Q = \text{emittált fotonok száma} / \text{abszorbeált fotonok száma} (< 1)$
- élettartam:



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

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

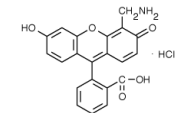
$$\bar{\lambda}_{phos} = 440 \text{ nm}$$

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

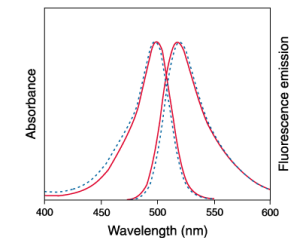
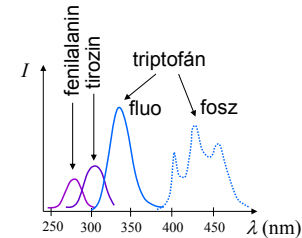
$$\tau_{phos} = 0,001 - 5 \text{ s}$$

27

Példák:

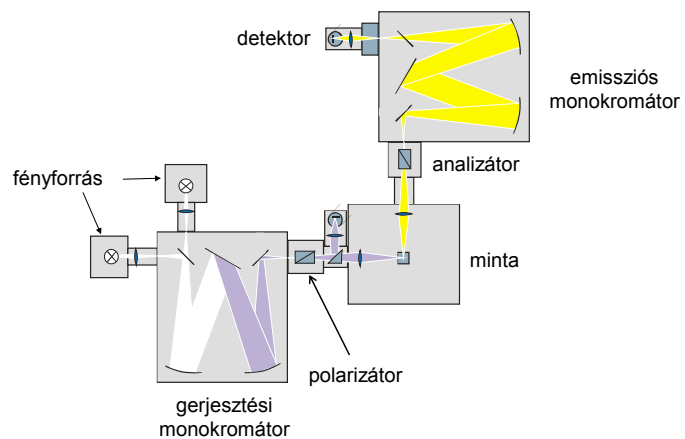


fluoreszcein



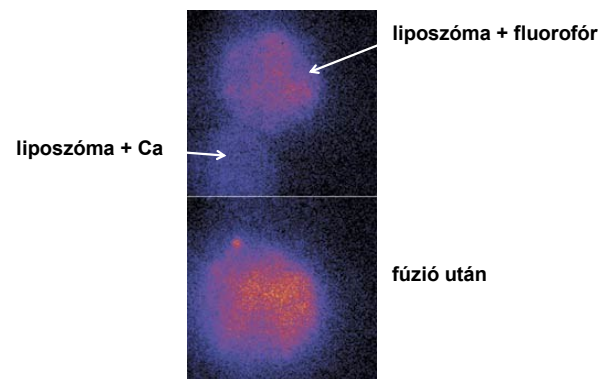
28

Mérés – luminométer felépítése



29

Példák:



30

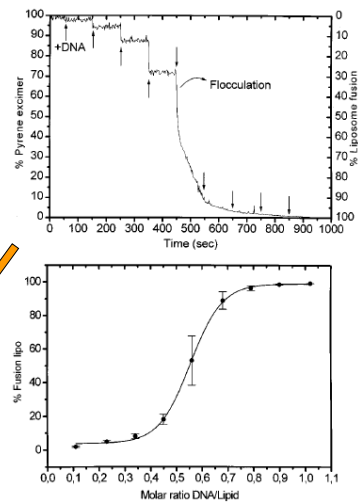
DNS és liposzóma kölcsönhatása (folyt.):

Fluorofór: pirén

Pirén excimer (~ koncentráció):

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

pirén fluoreszcenciája csökken \Rightarrow fúzió

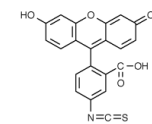


31

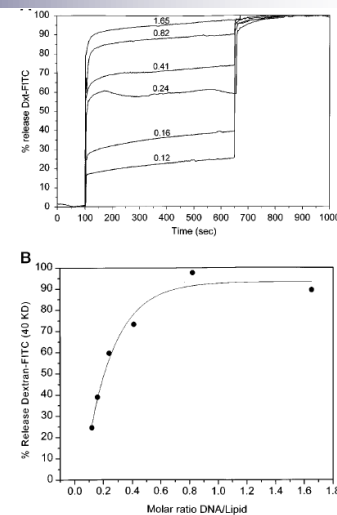
Fluorofór:

FITC-vel jelzett dextrán

(FITC: fluoreszcein-izotiocianát)

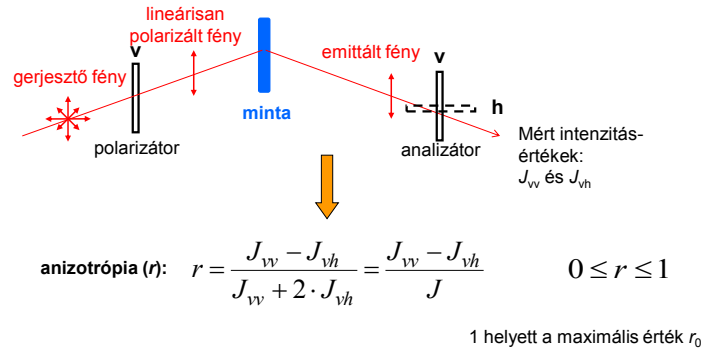


DNS destabilizálja a liposzómákat \Rightarrow dextrán kiáramlás, fúzió



32

Anizotrópia mérése



33

Perrin-egyenlet: $r = \frac{r_0}{1 + \tau / \phi}$ 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 mikroviszkózitást jelent.

34

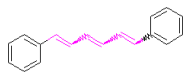
Liposzóma mikroviszkózitása a hőmérséklet függvényében:

Liposzóma: DPPC

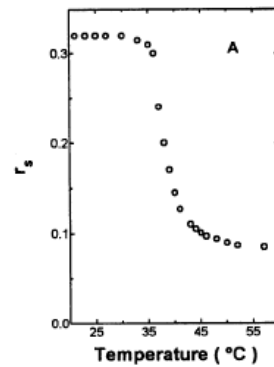
DPPC: dipalmitoil foszfatidilkolin

Fluorofór: DPH

DPH: difenil hexatrién



A fázisátalakulási hőmérséklet fölött jelentősen lecsökken a lipidréteg mikroviszkózitása.



35

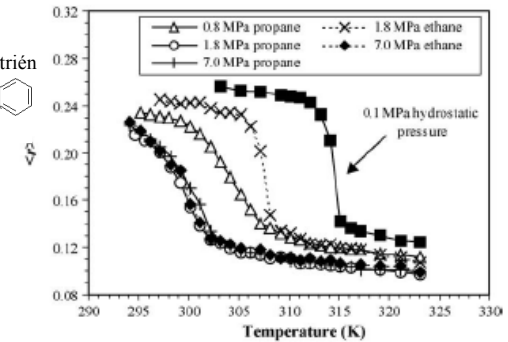
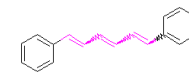
Alkánok és nyomás hatása a liposzóma mikroviszkózítására:

Liposzóma: DPPC

DPPC: dipalmitoil foszfatidilkolin

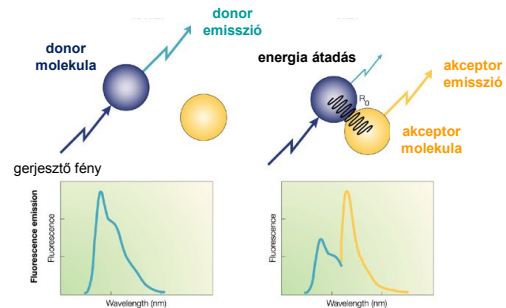
Fluorofór: DPH

DPH: difenil hexatrién



36

Förster-féle rezonancia energiatranszfer (FRET)



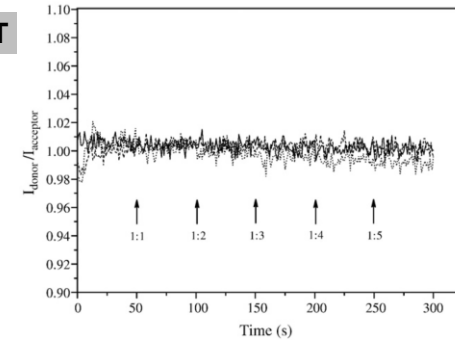
Mért mennyiség: donor/akceptor intenzitásarány

Nagyon erősen függ
a távolságtól!
→ „molekuláris
mérőszalag”

37

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

FRET



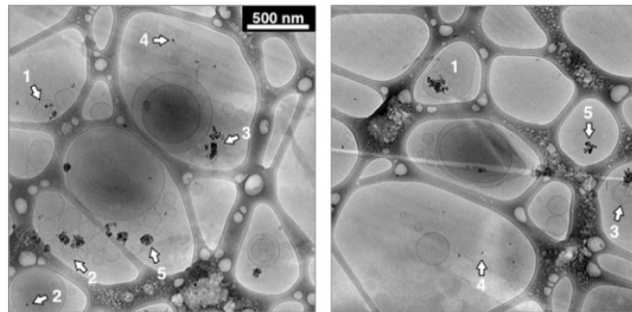
→ nincs változás

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

38

Magnetoliposzómák

Liposzóma: DPPC+koleszterin
Mágnes: Fe_3O_4 nanorészecskék

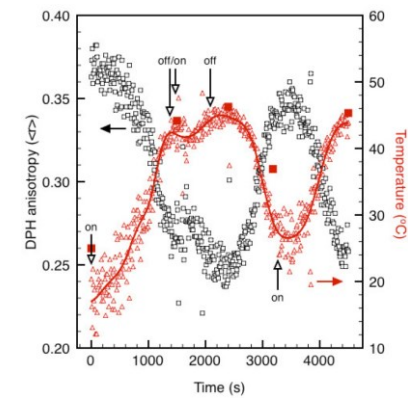


(TEM felvételek)

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

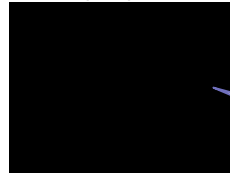
Principles of rational design of thermally targeted liposomes for local drug delivery

Roberto Tejera-Garcia, 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)



citostaticum,
a szokásos
mellékhatásokkal



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

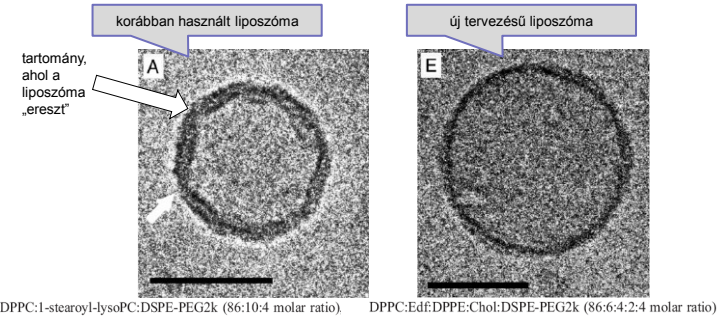
Van saját fluoreszcenciája

41

Elv:

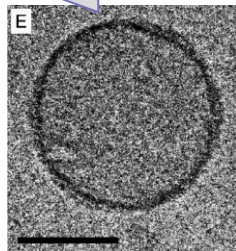
1. Daganat lokális felmelegítése 39–41°C-ra (T_R), pl. MRlgHIFU technikával
2. Hatóanyag bezárása olyan liposzómába melynek,
 - a) gél→fluid átmeneti hőmérséklete T_R közelében van,
 - b) hatóanyag kieresztése T_R alatt minél kisebb, T_R közelében minél nagyobb.

Liposzóma tervezése:

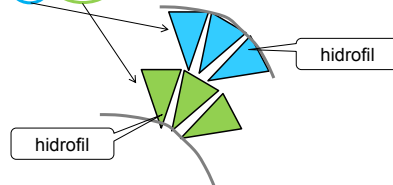


42

új tervezésű liposzóma

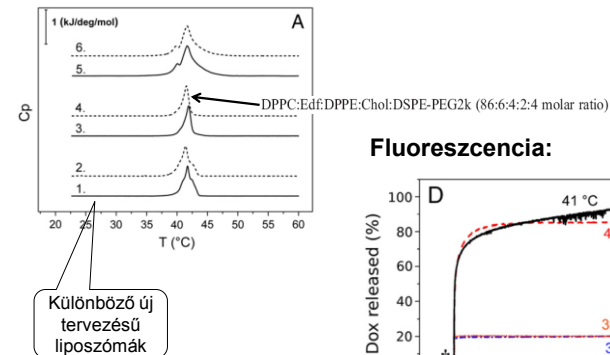


DPPC:Edf:DPPE:Chol:DSPE-PEG2k (86:6:4:2:4 molar ratio)

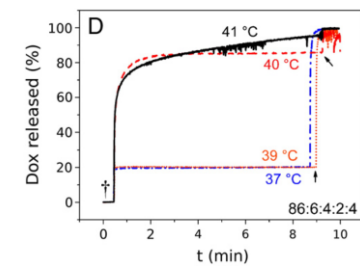


43

DSC:



Fluoreszcencia:



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

44



Fluoreszcencia:

