

## Kalorimetriás módszerek a liposzómák vizsgálatában

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

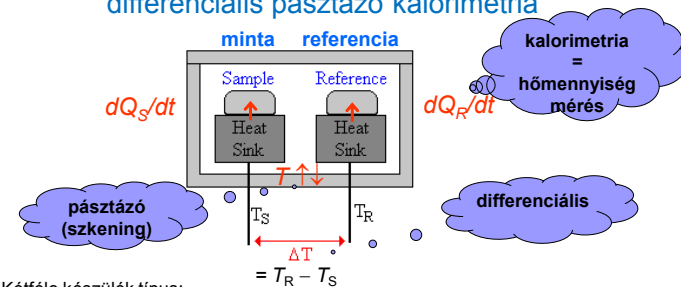
1

## DSC : differential scanning calorimetry



2

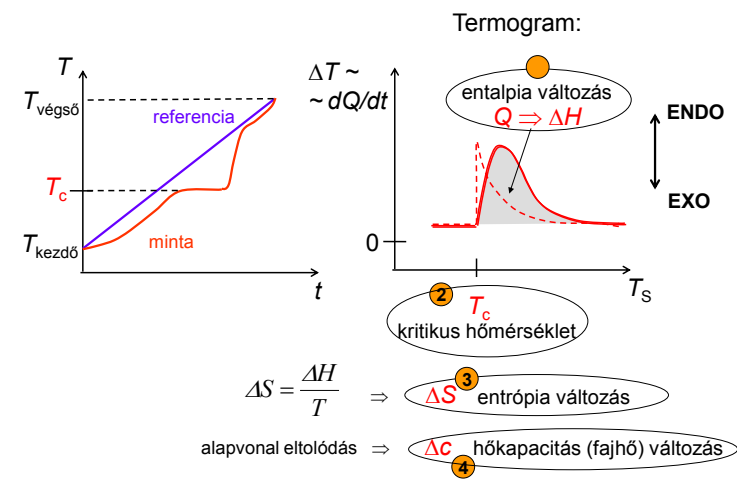
## DSC: differential scanning calorimetry differenciális pásztázó kalorimetria



Kétféle készülék típus:

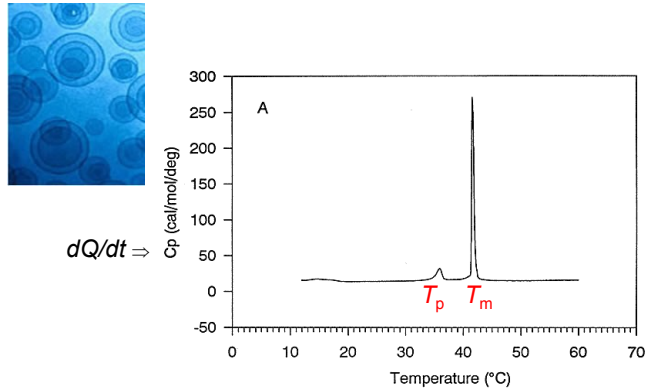
- 1 mért mennyiség:  $\Delta T \Rightarrow$  fűtőtéljesítmény szabályozása, hogy  $\Delta T = 0$  legyen  $\Rightarrow$  mért mennyiség:  $dQ_S/dt - dQ_R/dt = dQ/dt$
- 2 mért mennyiség:  $\Delta T \Rightarrow$  számolás:  $dQ/dt$

3

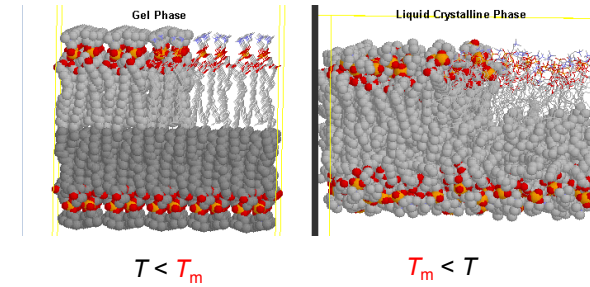


4

## Példa: DPPC multilamelláris liposzóma



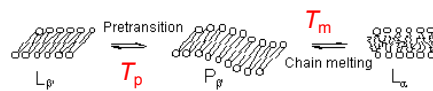
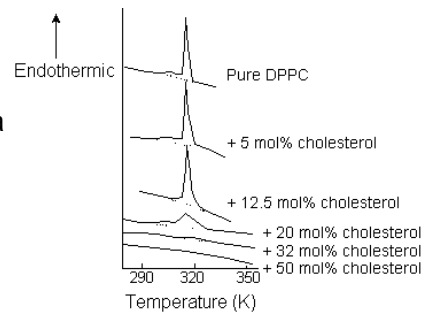
5



6

## Példa:

koleszterin hatása  
DPPC liposzóma  
termogramjára

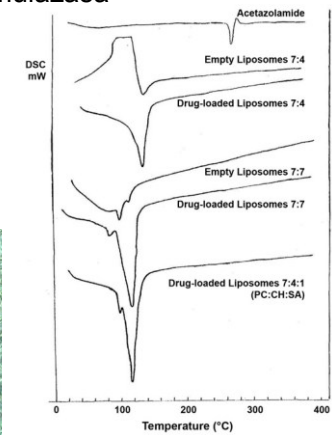
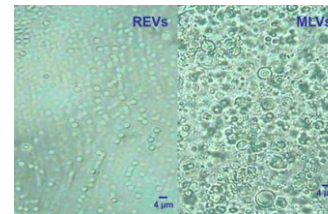


7

## 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)



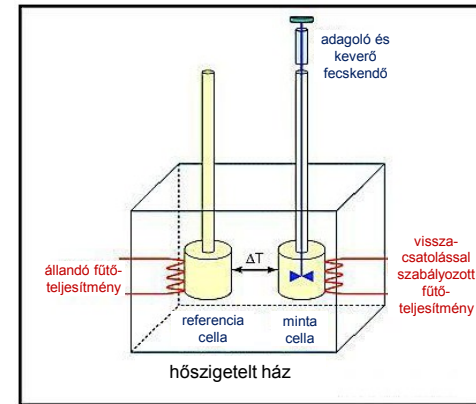
8

ITC: isotherm titration calorimetry  
izoterm titrációs kalorimetria



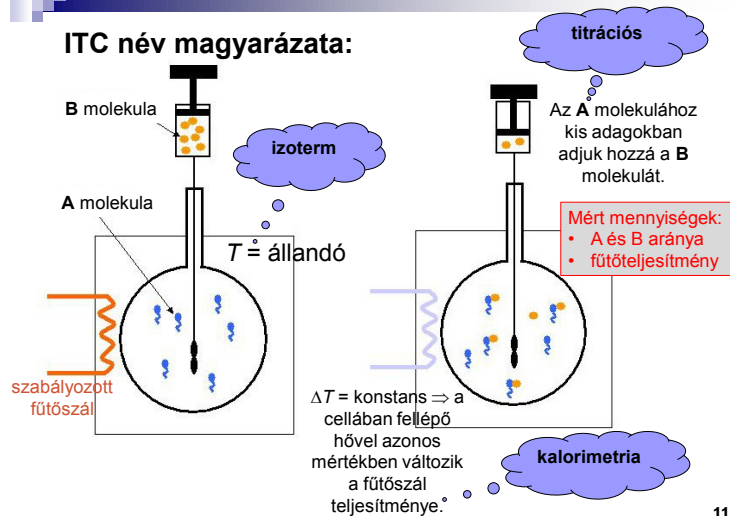
9

Felépítés:

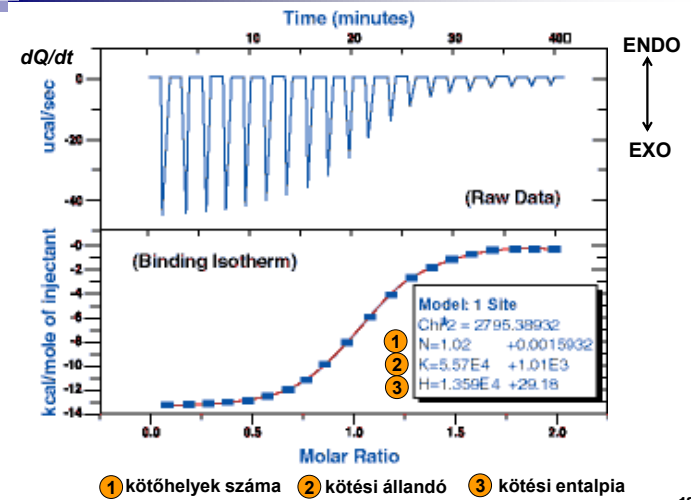


10

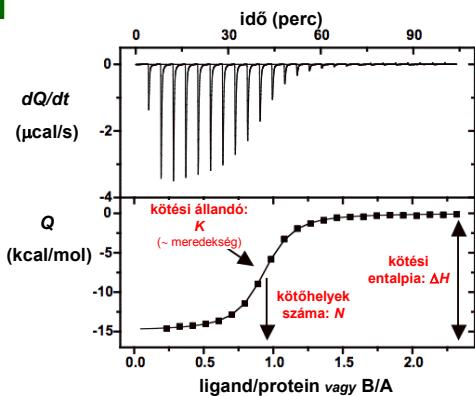
ITC név magyarázata:



11



12



13

Meghatározható mennyiségek:

$N, K, \Delta H$  +

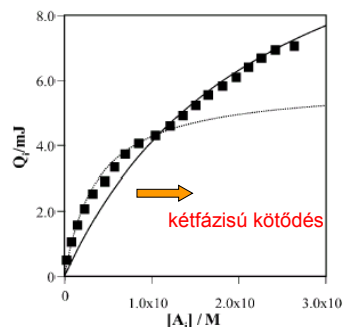
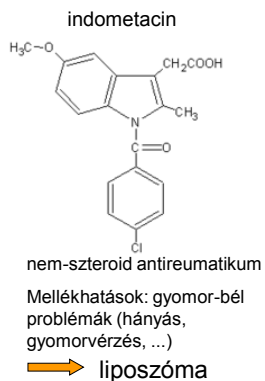
$$\left. \begin{aligned} \Delta G &= -RT \ln K \\ \Delta G &= \Delta H - T \cdot \Delta S \end{aligned} \right\} \text{4 } \Delta S \text{ kötési entropia}$$

**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

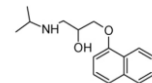
Példa: fájdalomcsillapító és liposzóma kölcsönhatása



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

15

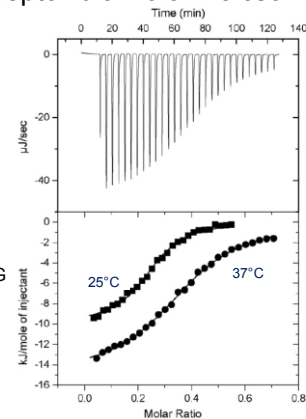
Példa: Béta-receptor blokkolók kölcsönhatása liposzómával



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

**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

17



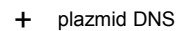
→ fluoreszcencja  
spektroszkopia

18

### Példa: DNS és liposzóma kölcsönhatása

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

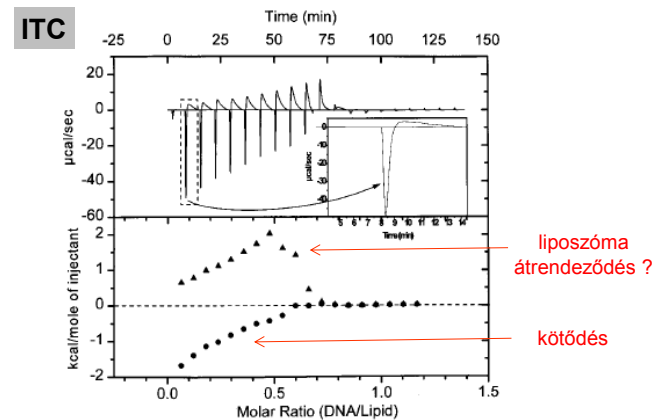
**Liposzóma: diC14-amidin**



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

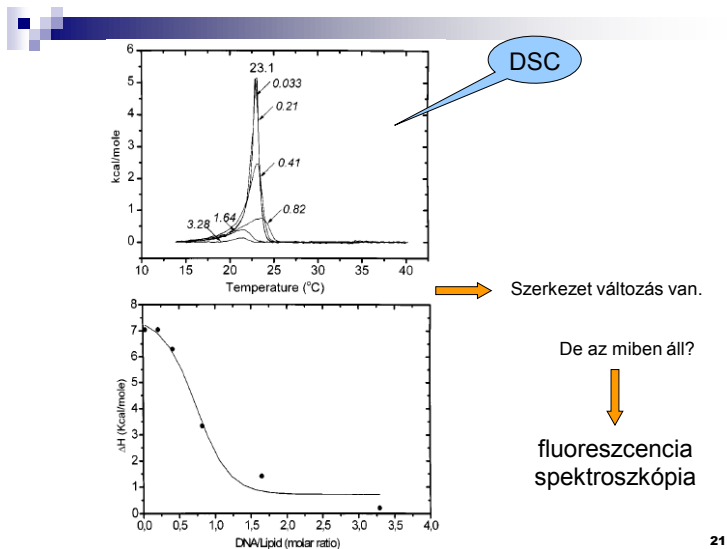
## Biophysical and Structural Properties of DNA·diC<sub>14</sub>-amidine Complexes

19



- kötődés

20



## Fluoreszcenciás módszerek a liposzómák vizsgálatában

22

## Fluoreszcencia

fluoreszcencia → lumineszcencia

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

**Megfigyelések:**

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

23

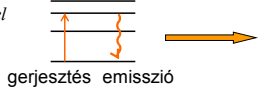
Gerjesztés szerint:

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)

24

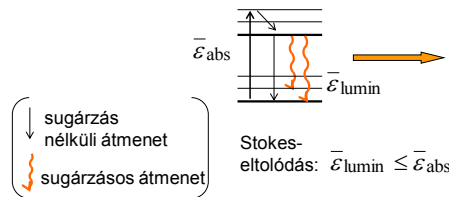
## Lumineszcencia mechanizmusa

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



vonalas spektrum  
(pl. Na)

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



vonalas/sávos spektrum  
(pl. fluoreszcein)

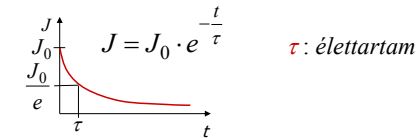
Stokes-eltolódás:  $\bar{\varepsilon}_{\text{lumin}} \leq \bar{\varepsilon}_{\text{abs}}$

sugárzás nélküli átmenet  
sugárzásos átmenet

25

## Lumineszcenciafény jellemzése

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

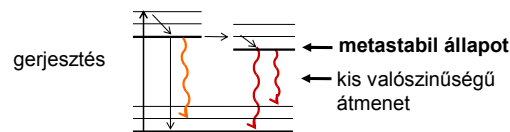


$$J = J_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}}$$

$\tau$ : élettartam

26

## Fluoreszcencia és foszforeszcencia



gerjesztés

metastabil állapot

kis valószínűségű átmenet

**fluoreszcencia foszforeszcencia**

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

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

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

pl. triptofán:

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

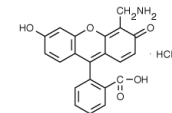
$$\bar{\lambda}_{\text{phos}} = 440 \text{ nm}$$

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

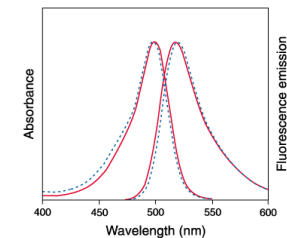
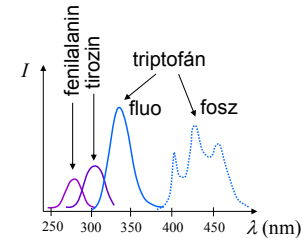
$$\tau_{\text{phos}} = 0,001 - 5 \text{ s}$$

27

Példák:

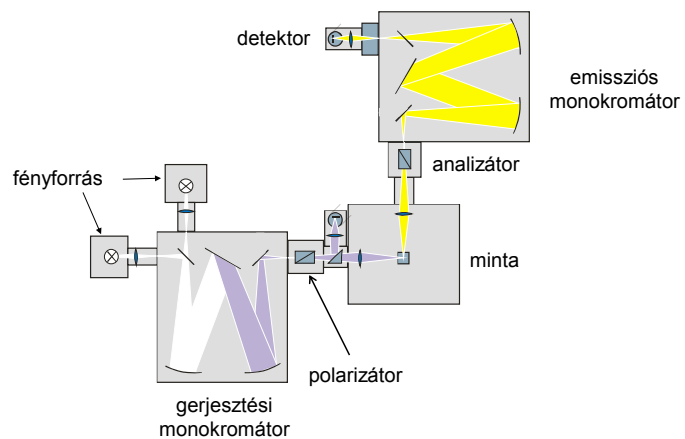


fluoreszcein



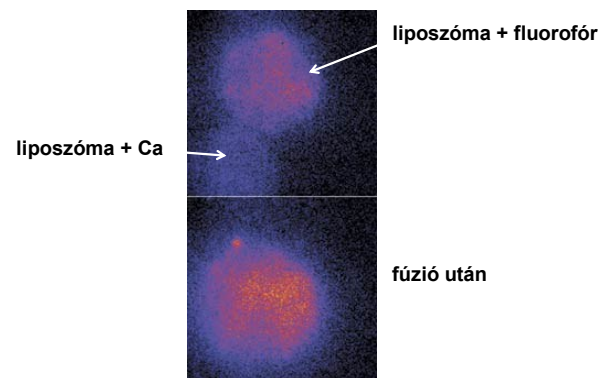
28

## Mérés – luminométer felépítése



29

## Példák:



30

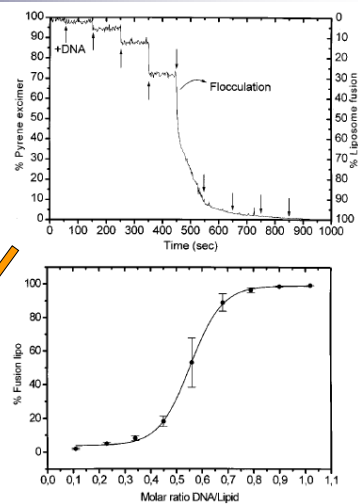
## DNS és liposzóma kölcsönhatása (folyt.):

Fluorofór: pirén

Pirén excimer (~ koncentráció):

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

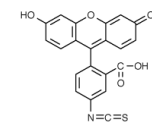
pirén fluoreszcenciája csökken  $\Rightarrow$  fúzió



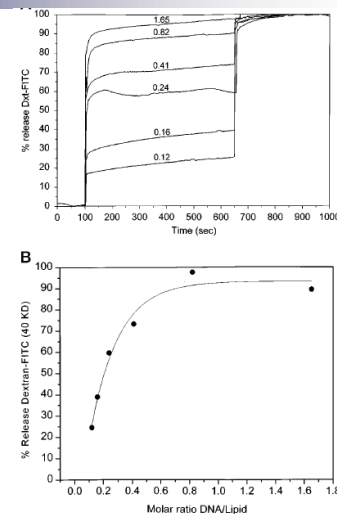
31

Fluorofór:  
FITC-vel jelzett dextrán

(FITC: fluoreszcein-izotiocianát)



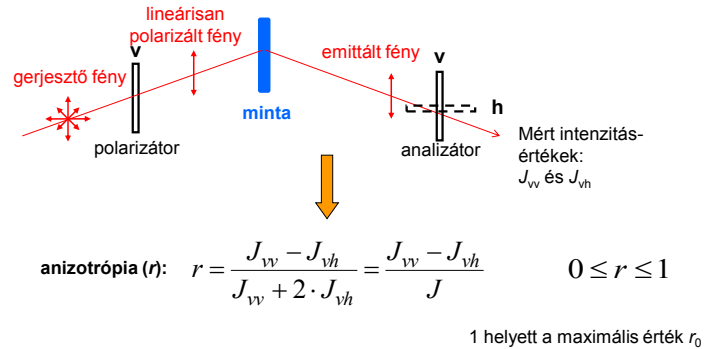
DNS destabilizálja a liposzómákat  $\Rightarrow$  dextrán kiáramlás, fúzió



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

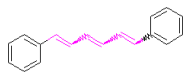
Liposzóma mikroviszkozítása a hőmérséklet függvényében:

**Liposzóma: DPPC**

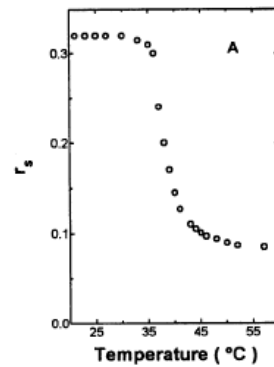
DPPC: dipalmitoil foszfatidilkolin

**Fluorofór: DPH**

DPH: difenil hexatrién



A fázisátalakulási hőmérséklet fölött jelentősen lecsökken a lipidréteg mikroviszkozítása.



35

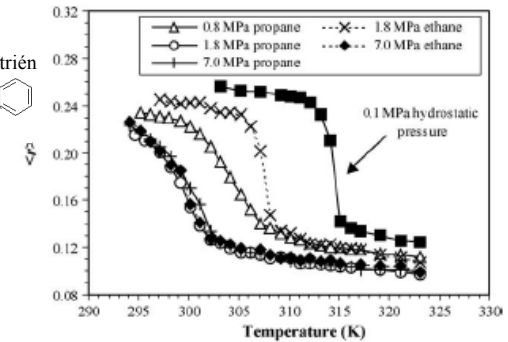
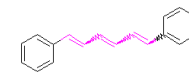
Alkánok és nyomás hatása a liposzóma mikroviszkozítására:

**Liposzóma: DPPC**

DPPC: dipalmitoil foszfatidilkolin

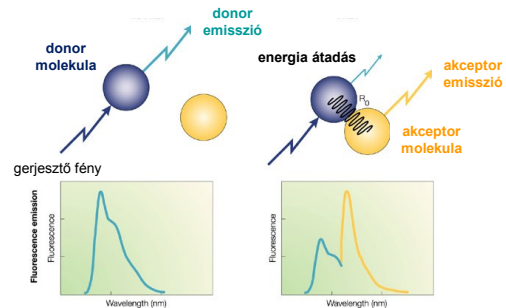
**Fluorofór: DPH**

DPH: difenil hexatrién



36

## Förster-féle rezonancia energiatranszfer (FRET)



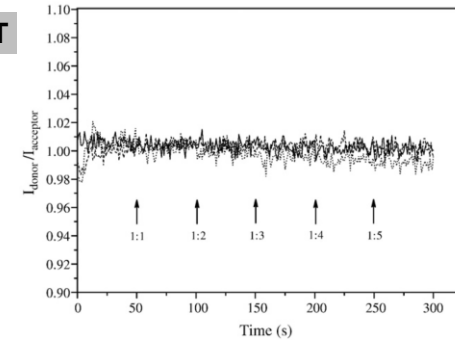
Mért mennyiség: donor/akceptor intenzitásarány

Nagyon erősen függ  
a távolságtól!  
→ „molekuláris  
mérőszalag”

37

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

FRET



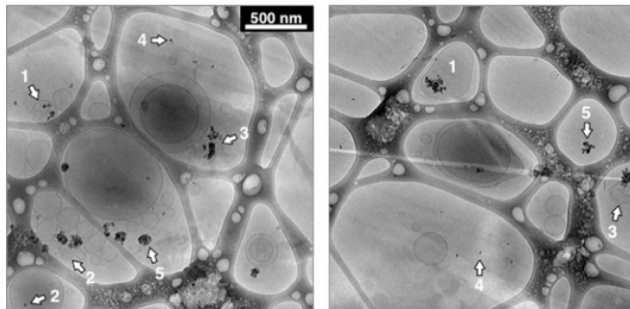
→ nincs változás

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

38

## Magnetoliposzómák

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

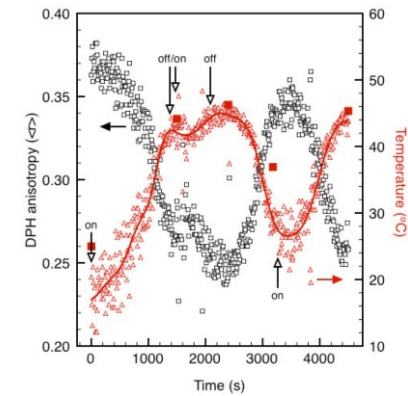


(TEM felvételek)

39

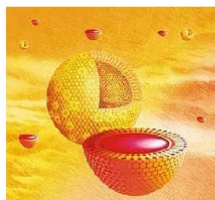
## Melegítés rádióhullámokkal

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



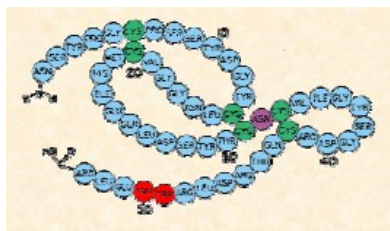
40

## Liposzómák orvosi és gyógyszerési felhasználása



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

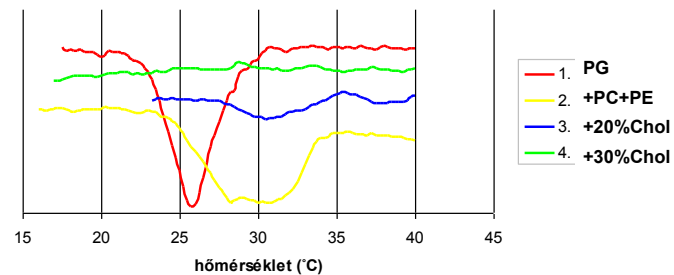
### epidermális növekedési faktor (EGF)



41

### Epithelsejteket modellező liposzóma:

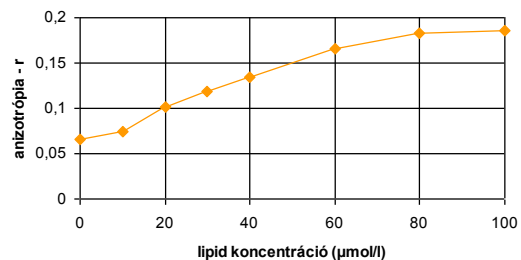
#### DSC termogram



42

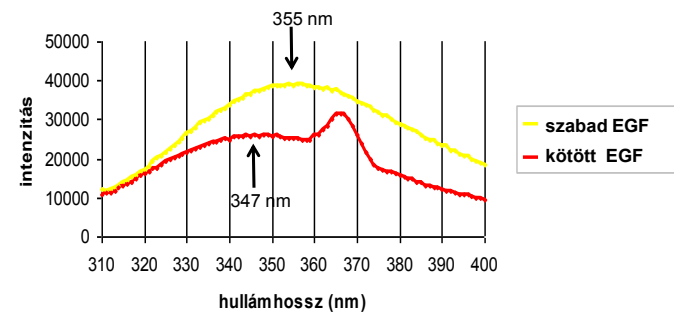
## EGF kötődése

#### steady-state anizotrópia mérések



43

#### EGF emissziós spektruma



44