

## Kalorimetriás módszerek a liposzómák vizsgálatában

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

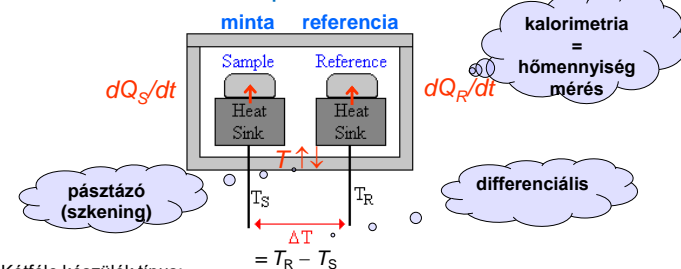
1

DSC : differential scanning calorimetry



2

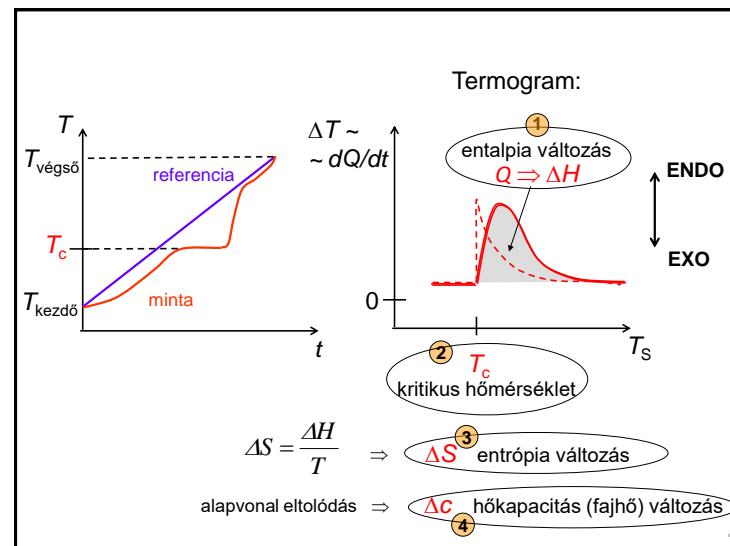
DSC: differential scanning calorimetry  
differenciális pásztázó kalorimetria



Kétféle készülék típus:

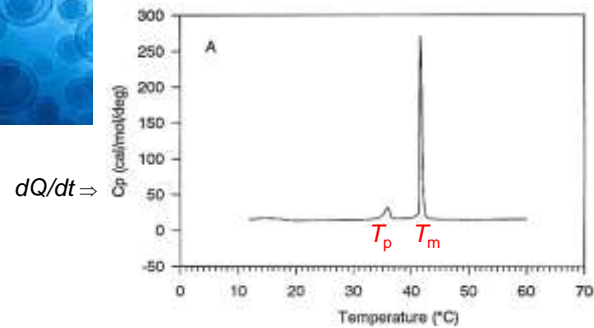
- 1 mért mennyiség:  $\Delta T \Rightarrow$  fűtőtéljesítmény szabályozása, hogy  $\Delta T = 0$  legyen  $\Rightarrow$  mért mennyiség:  $dQ_S/dt - dQ_R/dt = dQ/dt$
- 2 mért mennyiség:  $\Delta T \Rightarrow$  számolás:  $dQ/dt$

3

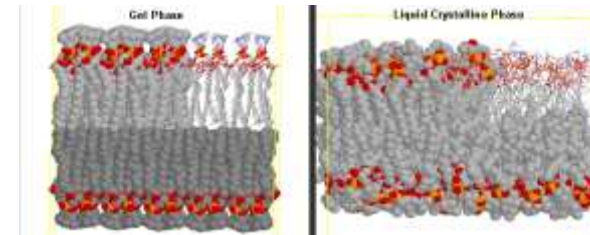


4

## Példa: DPPC multilamelláris liposzóma



5



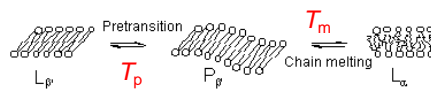
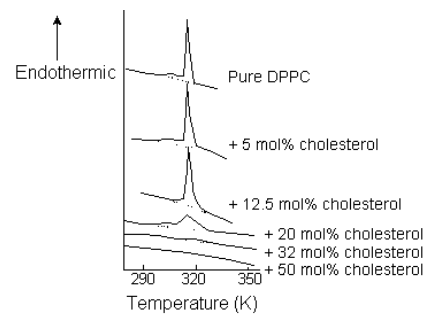
$$T < T_m$$

$$T_m < T$$

6

## Példa:

koleszterin hatása  
DPPC liposzóma  
termogramjára

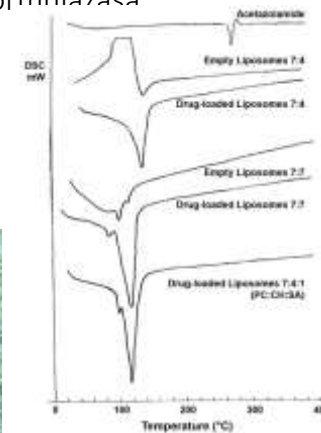


7

## Példa: Acetazolamid formulázása

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

liposzóma

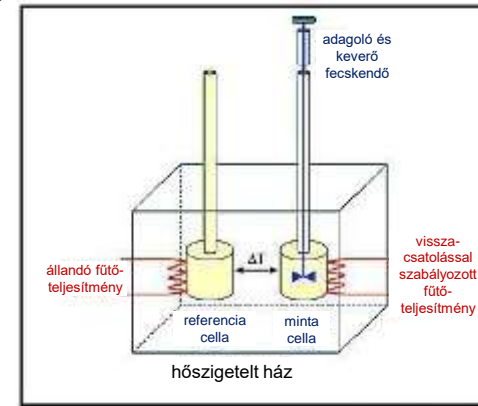


ITC: isotherm titration calorimetry  
izoterm titrációs kalorimetria



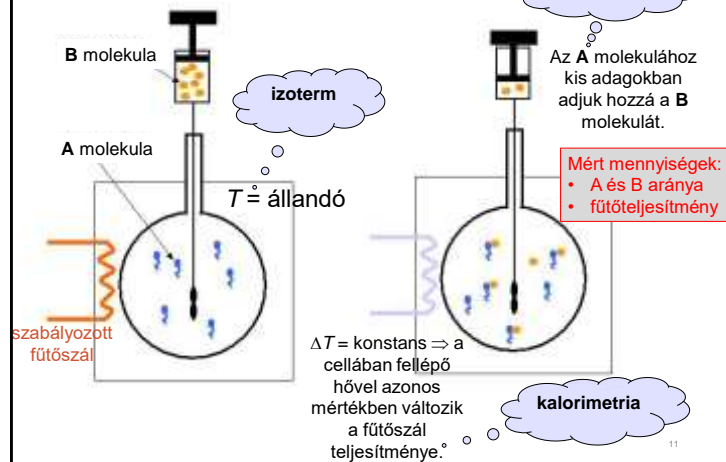
9

Felépítés:

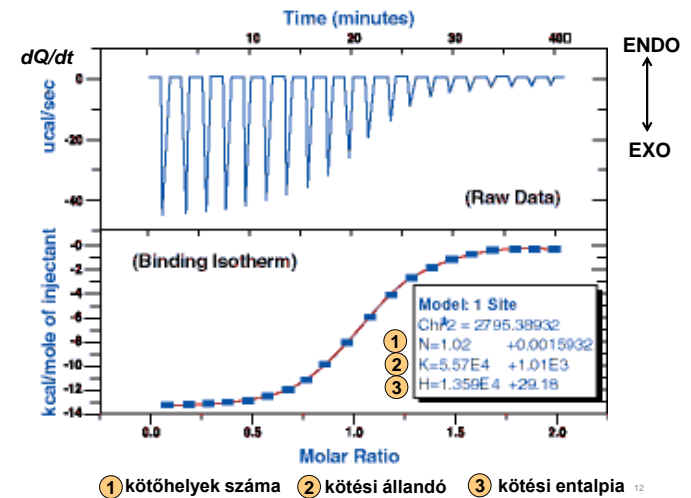


10

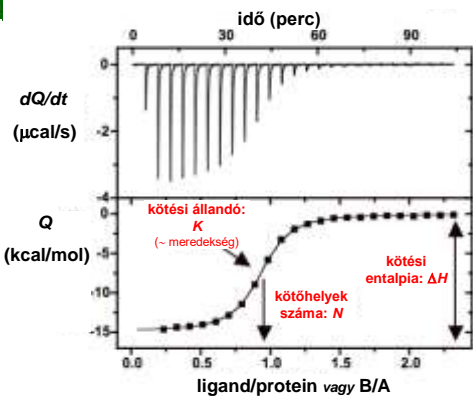
ITC név magyarázata:



11



1 kötőhelyek száma 2 kötési állandó 3 kötési entalpia



13

Meghatározható mennyiségek:

$N, K, \Delta H$  +

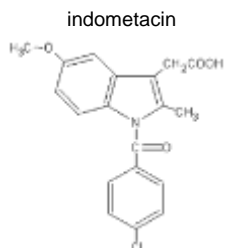
$$\left. \begin{aligned} \Delta G &= -RT \ln K \\ \Delta G &= \Delta H - T \cdot \Delta S \end{aligned} \right\} \textcircled{4} \Delta S \text{ kötési entropia}$$

**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

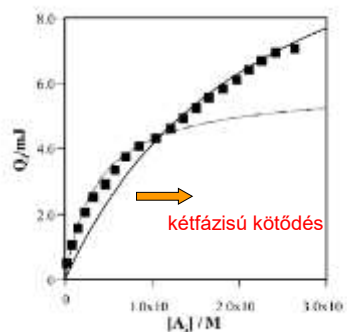
Példa: fájdalomcsillapító és liposzóma kölcsönhatása



nem-szteroid antireumatikum

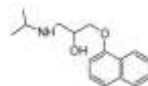
Mellékhatások: gyomor-bél problémák (hányás, gyomorvérzés, ...)

➡ liposzóma



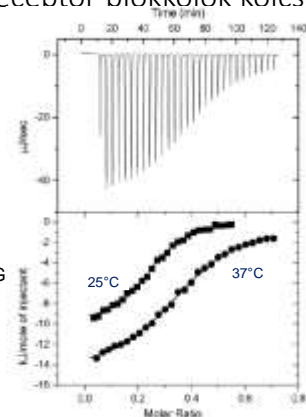
Biophysical Journal, Volume 86, February 2004, 346-354  
Interaction of Antiinflammatory Drugs with EPC Liposomes: Calorimetric Study in a Broad Concentration Range

Példa: Béta-receptor blokkolók kölcsönhatása liposzómával



+

Liposzóma: POPC+POPG



Vizsgálták:

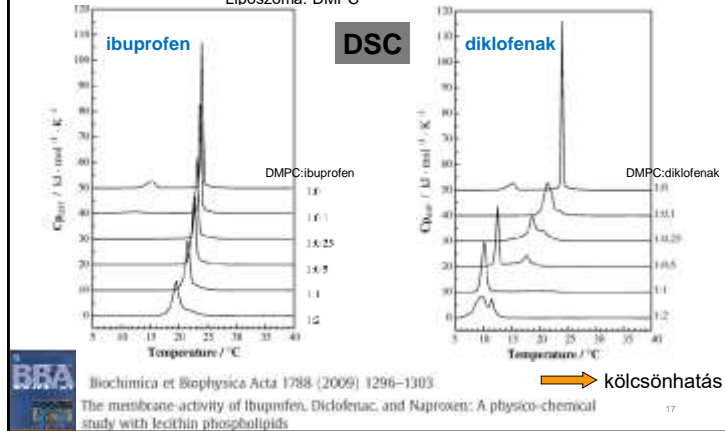
- ✦ koncentráció
- ✦ ionerősség
- ✦ hőmérséklet
- ✦ liposzóma méret hatását.



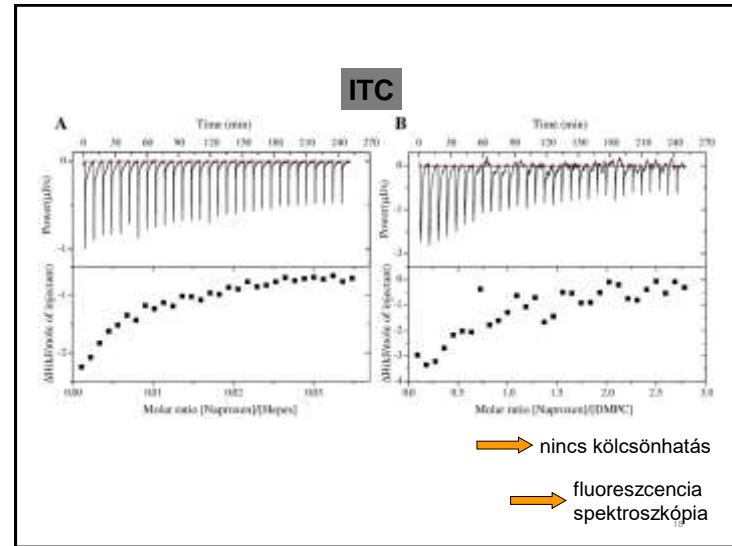
Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 78 (2010) 275-282

Microcalorimetric and zeta potential study on binding of drugs on liposomes

Példa: nem-szteroid gyulladásgátlók hatása a membránra  
 Nem-szteroid gyulladásgátlók: pl. ibuprofen, diklofenak, naproxen  
 Liposzóma: DMPC



→ kölcsönhatás



Példa: DNS és liposzóma kölcsönhatása

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

Liposzóma: diC14-amidin



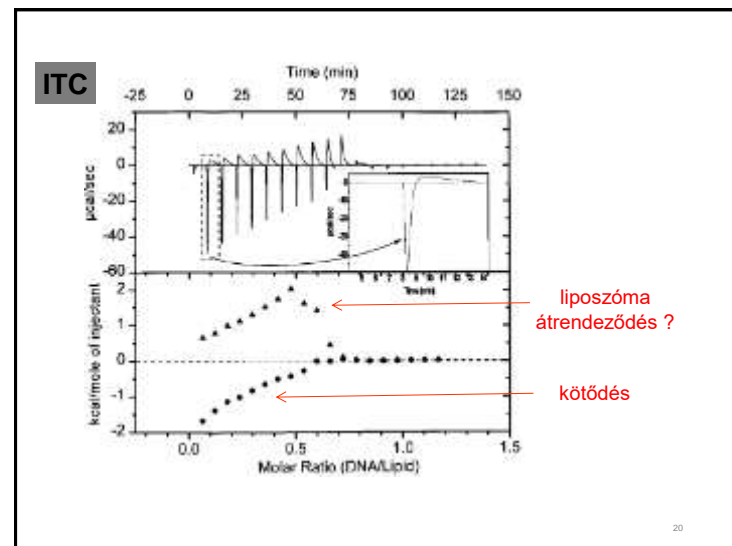
+ plazmid DNS

The Journal of Biological Chemistry  
 © 2000 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

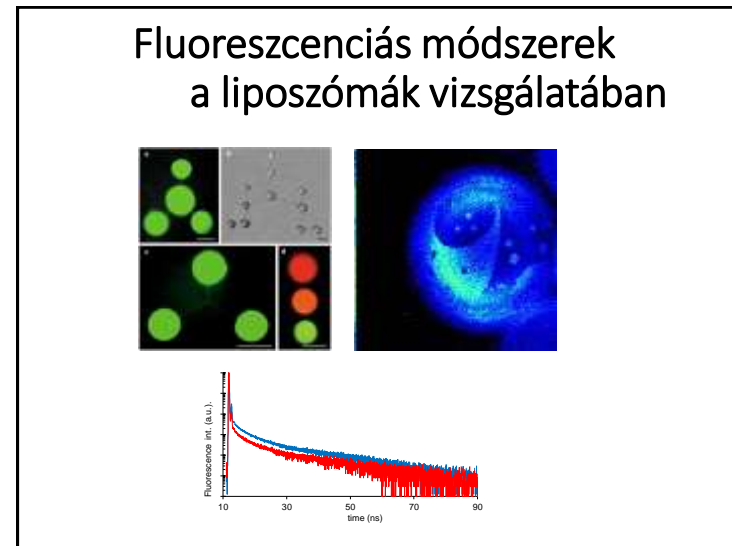
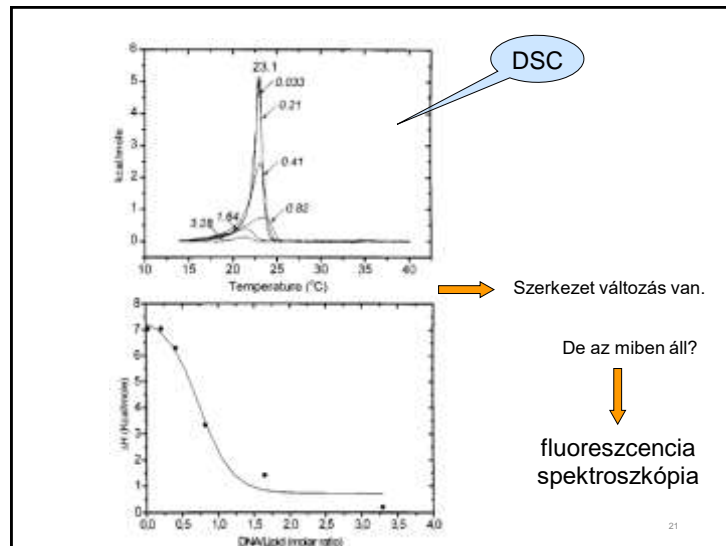
Biophysical and Structural Properties of  
 DNA-diC<sub>14</sub>-amidine Complexes

Vol. 275, No. 36, Issue of September 22, pp. 6693–6701, 2000  
 Printed in U.S.A.

19



20



## Fluoreszcencia

fluoreszcencia → lumineszcencia

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

**Megfigyelések:**

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

23

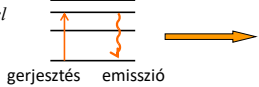
## Gerjesztés szerint:

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

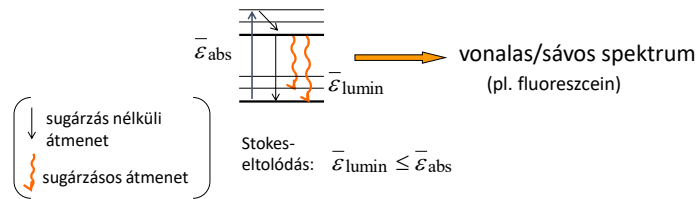
## Lumineszcencia mechanizmusa

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



vonalas spektrum  
(pl. Na)

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



vonalas/sávos spektrum  
(pl. fluorescein)

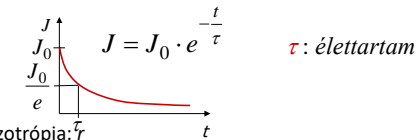
Stokes-eltolódás:  $\bar{\epsilon}_{lumin} \leq \bar{\epsilon}_{abs}$

sugárzás nélküli átmenet  
sugárzásos átmenet

25

## Lumineszcenciafény jellemzése

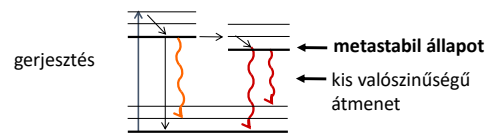
- vonalak, sávok helyzete, alakja, intenzitása
- Stokes-féle eltolódás  $[\bar{\epsilon}_{lumin} \leq \bar{\epsilon}_{abs}]$
- kvantumhatásfok:  $Q = \text{emittált fotonok száma} / \text{abszorbeált fotonok száma} (< 1)$
- élettartam:



- anizotrópia:  $\tau_r$
- molekulák közötti energia átadás (FRET)

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:

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

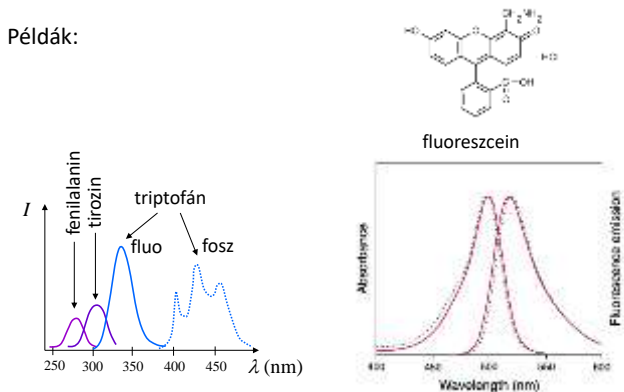
$$\bar{\lambda}_{phos} = 440 \text{ nm}$$

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

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

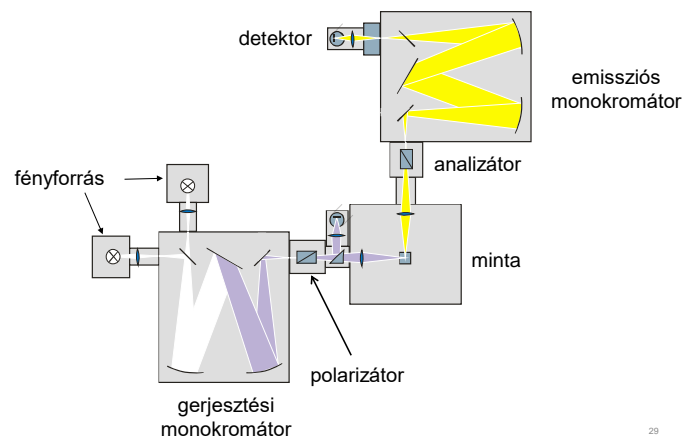
27

Példák:



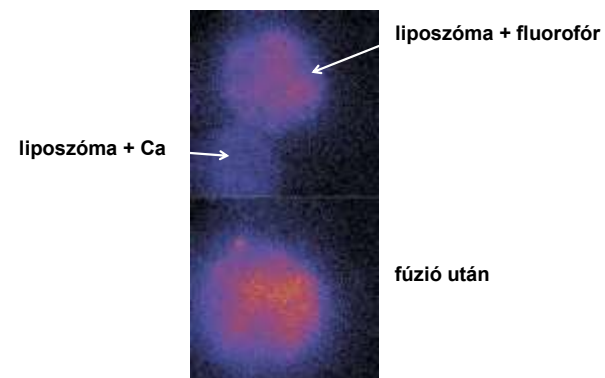
28

## Mérés – luminométer felépítése



29

## Példák:



30

## DNS és liposzóma kölcsönhatása (folyt.):

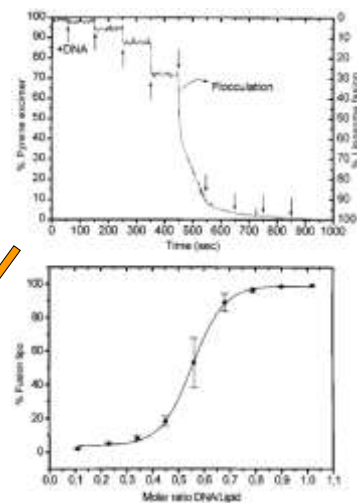
Fluorofór: pirén



Pirén excimer (~ koncentráció):

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

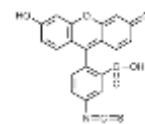
pirén fluoreszcenciája csökken  $\Rightarrow$  fúzió



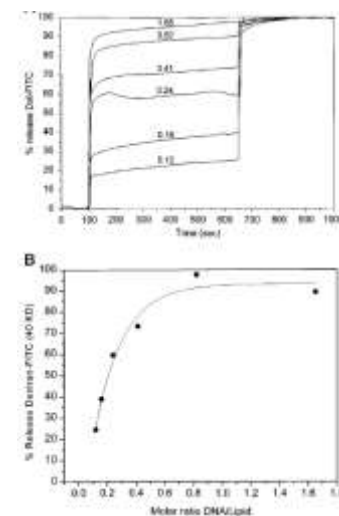
Fluorofór:

FITC-vel jelzett dextrans

(FITC: fluoreszcein-izotiocianát)

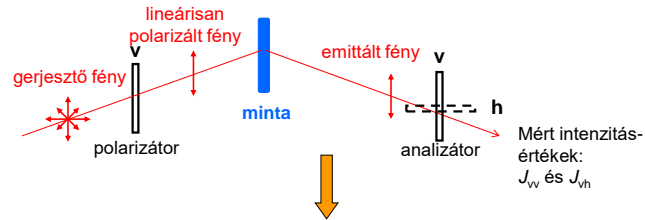


DNS destabilizálja a liposzómákat  $\Rightarrow$  dextrans kiáramlás, fúzió





## Anizotrópia mérése



anizotrópia ( $r$ ):

$$r = \frac{J_{vv} - J_{vh}}{J_{vv} + 2 \cdot J_{vh}} = \frac{J_{vv} - J_{vh}}{J}$$

1 helyett a maximális érték  $r_0$

$$0 \leq r \leq 1$$

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**

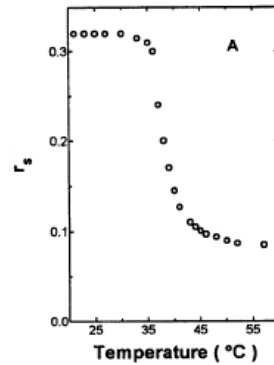
DPPC: dipalmitoil foszfatidilkolin

**Fluorofór: DPH**

DPH: difenil hexatrién



A fázisátalakulási hőmérséklet fölött jelentősen lecsökken a lipíd réteg mikroviszkozitása.



35

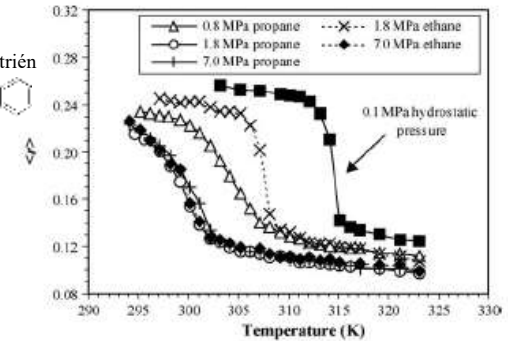
Alkánok és nyomás hatása a liposzóma mikroviszkozítására:

**Liposzóma: DPPC**

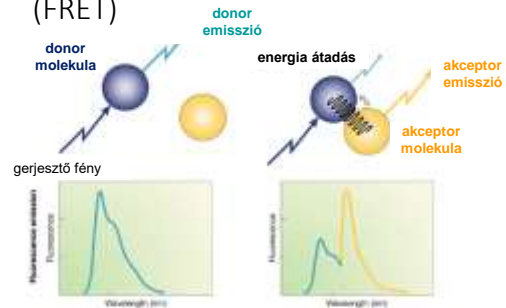
DPPC: dipalmitoil foszfatidilkolin

**Fluorofór: DPH**

DPH: difenil hexatrién



## Förster-féle rezonancia energiatranszfer (FRET)



Mért mennyiség: donor/akceptor intenzitásarány

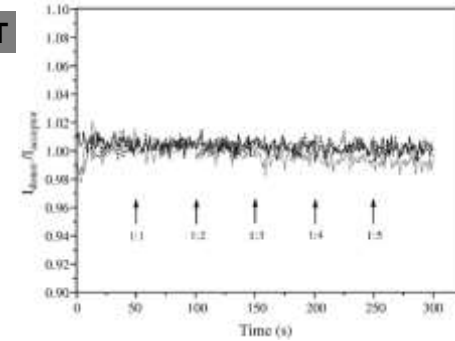
Nagyon erősen függ a távolságtól!

→ „molekuláris mérőszalag”

37

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

FRET



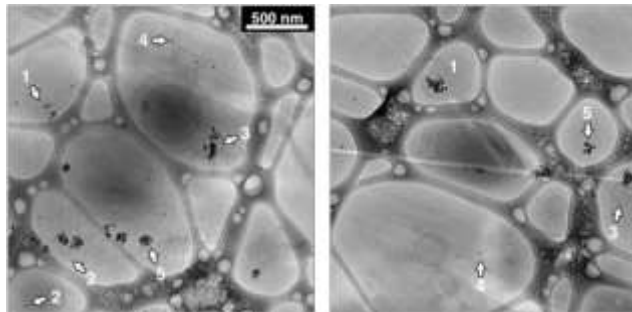
→ nincs változás

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

38

## Magnetoliposzómák

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



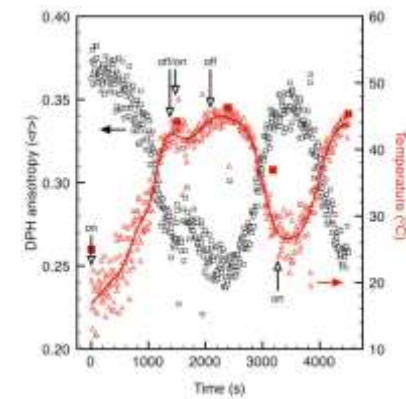
(TEM felvételek)

39

## Melegítés rádióhullámokkal

$f = 281 \text{ kHz}$

Fluorofór: DPH



40

## Példa: hőmérséklettel aktivált liposzóma

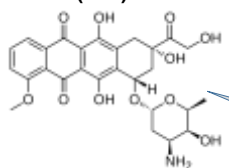


### Principles of rational design of thermally targeted liposomes for local drug delivery

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

<sup>1</sup>Molecular Biophysics and Biomaterials Group, Department of Biomedical Engineering and Computational Science, School of Science, Aalto University, Espoo, Finland  
Received 7 January 2014; accepted 31 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.

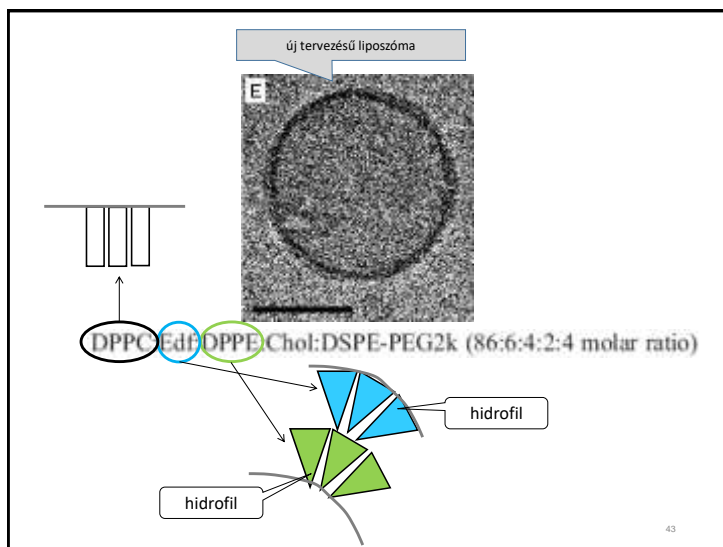
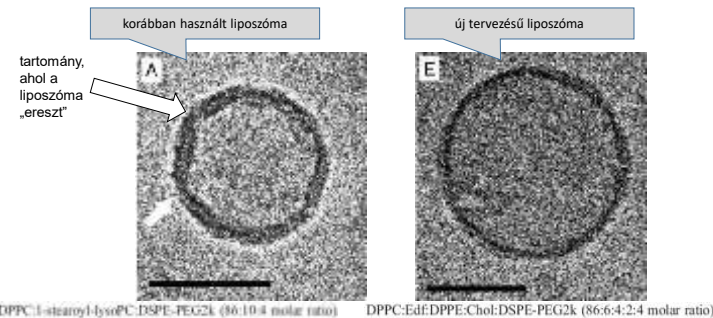
Van saját fluoreszcenciája

41

#### Elv:

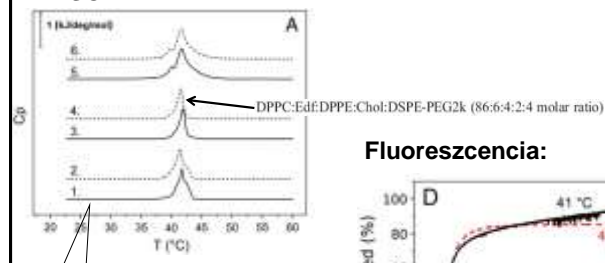
1. Daganat lokális felmelegítése 39–41°C-ra ( $T_R$ ), pl. MRlgHIFU technikával
2. Hatóanyag bezárása olyan liposzómába melynek,
  - a) gél→fluid átmeneti hőmérséklete  $T_R$  közelében van,
  - b) hatóanyag kieresztése  $T_R$  alatt minél kisebb,  $T_R$  közelében minél nagyobb.

#### Liposzóma tervezése:



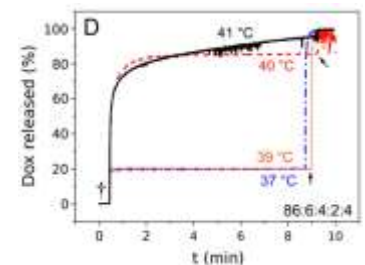
43

#### DSC:



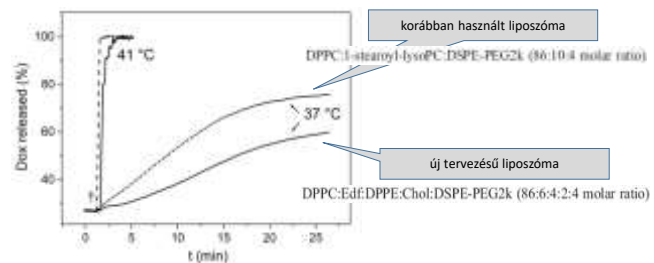
Különböző új tervezésű liposzómák

#### Fluoreszcencia:



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

### Fluoreszcencia:



45

REKTORI PÁLYÁZAT

### Liposzómák orvosi és gyógyszerési felhasználása



Dr. Árkai (FOLK) és  
Kertész, Fülöp, Árkai (FOLK)  
Tudományos, Tölgyes, Fülöp  
Egyetem, Pécs  
Szegedi Egyetem  
Biofizikai és Vegetációbiológiai Intézet

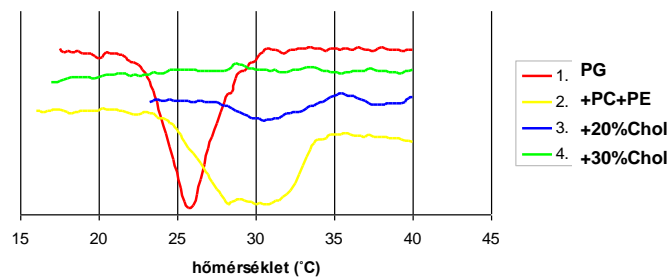
### epidermális növekedési faktor (EGF)



46

### Epithelsejteket modellező liposzóma:

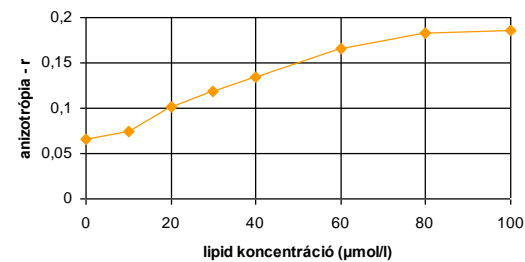
#### DSC termogram



47

### EGF kötődése

#### steady-state anizotrópia mérések



48

