

Název: **Studium vlastností liposomů jako  
přenašečů léčiv pomocí různých  
analytických metod**

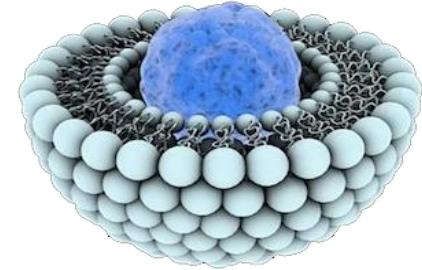
Školitel: Roman Guráň

Datum: 6.2.2014

# Cíle práce

- Vypracovat literární rešerši zaměřenou na liposomy, jejich vlastnosti a využití.
- Ověřit přítomnost doxorubicinu v syntetizovaných liposomech pomocí MALDI-TOF.
- Pomocí FIA-ED a vytvoření diferenčních hydrodynamických voltamogramů zjistit rozdíly v amperometrické detekci doxorubicinu uzavřeného v liposomech lišících se koncentrací cholesterolu v lipidové dvojvrstvě.
- Ověřit možnost uvolnění doxorubicinu z liposomů působením dodecylsíranu sodného pomocí fluorescenční spektroskopie.
- Zjistit schopnost liposomů transportovat doxorubicin do buněk zlatého stafylokoka pomocí inverzní fluorescenční mikroskopie.
- Zjistit toxicitu doxorubicinu přenášeného v daných liposomech na bakteriální kultuře zlatého stafylokoka.

# Liposomy

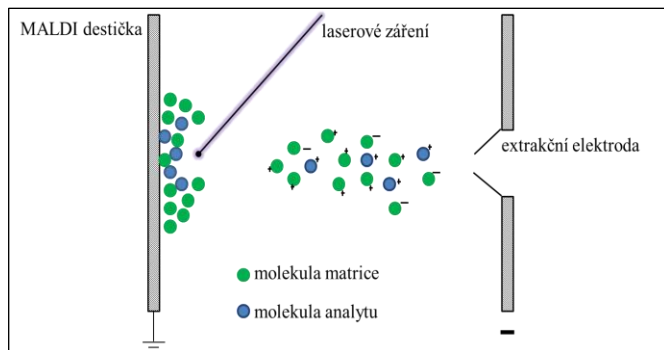


- Poprvé byly popsány v roce 1964.
- Prakticky chvíli po jejich objevu začaly být považovány za potenciální přenašeče léčiv.
- Důvod použití nanotransportérů pro léčiva – snížení nežádoucí toxicity léčiva a možnost cíleného transportu a zvýšení efektivity.
- Běžnou součástí lipidové dvojvrstvy je cholesterol. Podporuje stabilitu dvojvrstvy a ovlivňuje její permeabilitu a rozpustnost.
- Uvolnění léčiva z liposomů je obvykle způsobeno fúzí liposomové membrány s buněčnou membránou, ale lze využít i jiných způsobů uvolnění léčiva (změna pH, ultrazvuk, působení detergentu).

# Analýza liposomálního doxorubicinu pomocí MALDI-TOF

- MALDI = matrix assisted laser desorption/ionization = laserová desorpce/ionizace za účasti matrice
- TOF = time-of-flight = průletový hmotnostní analyzátor; analyzuje ionty na základě jejich doby letu analyzátozem:

$$\frac{m}{z} = 2eU \frac{t^2}{L^2}$$



**Legenda:** Schéma MALDI

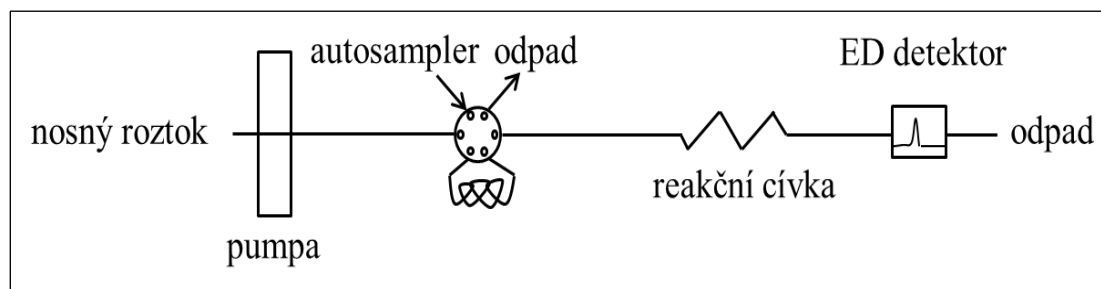


**Legenda:** Bruker ultrafleXtreme

Experimentální podmínky: nasycený roztok 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny (DHB) v 50% MeOH a 0,1% trifluoroctové kyselině; *dried-droplet* metoda nanášení; kalibrace pomocí monoizotopických píků matrice a směsi peptidů; reflektorový pozitivní mód; výkon laseru nastaven 5-10 % nad prahovou hodnotu; 355 nm Nd:YAG laser s maximální energií 43,2  $\mu$ J a opakovací frekvencí 2000 Hz, fokusace laseru na průměr až 10  $\mu$ m.

# FIA-ED analýza liposomálního doxorubicinu

- FIA = flow injection analysis = průtoková injekční analýza
- FIA umožňuje automatizované měření sady vzorků, řídit reakce analytů s činidly i např. zapojit více detektorů v sérii nebo paralelně.
- Výsledky ve formě diferenčních hydrodynamických voltamogramů (pojato jako závislost rozdílu ploch píku – analytu a blanku – na potenciálu).



**Legenda:** Schéma uspořádání FIA systému

Experimentální podmínky: pumpa model 584, elektrochemický detektor Coulochem III s amperometrickou celou model 5040 (pracovní elektroda ze skelného uhlíku, referenční paladiová elektroda, pomocná platinová elektroda), autosampler model 542 (vše ESA Inc., MA, USA); objem dávkovací smyčky byl 20  $\mu\text{l}$ ; průtok nosného roztoku byl 1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ; potenciálový rozsah 100-1200 mV se 100 mV krokem.

# Spektrofotometrická analýza liposomálního a uvolněného doxorubicinu

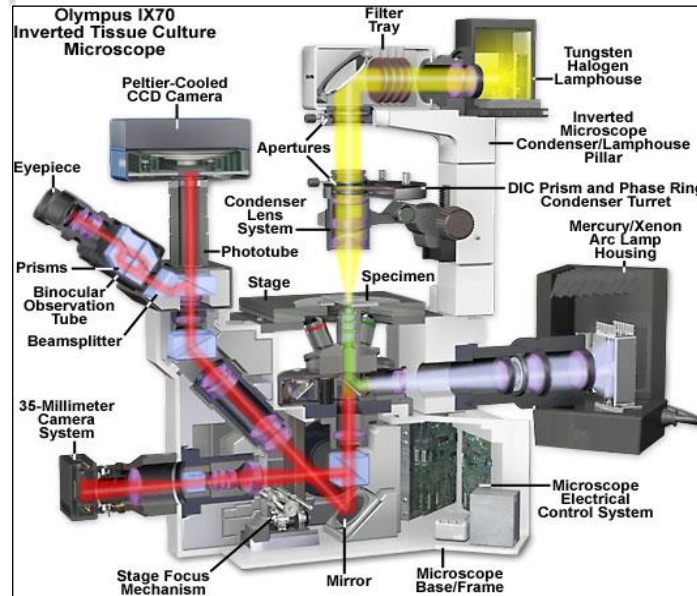
- Spektrofotometrie byla využita pro změření absorpčních a fluorescenčních spekter doxorubicinu uzavřeného v liposomech a doxorubicinu uvolněného z liposomů po přidavku 30 mM SDS.



**Legenda:** Tecan Infinite M200 PRO

Experimentální podmínky: měření v UV-propustné 96jamkové destičce, pipetováno vždy 50  $\mu$ l vzorku; xenonová UV lampa; absorpční sken byl proveden v rozsahu 230-800 nm s krokem po 5 nm; fluorescenční sken byl proveden v rozsahu 510-850 nm s krokem po 5 nm při vlnové délce excitačního záření 480 nm; detekce fluorescence pomocí fotonásobiče a detekce absorbance pomocí křemíkové fotodiody.

# Inverzní fluorescenční mikroskopie buněk zlatého stafylokoka po inkubaci s liposomálním doxorubicinem

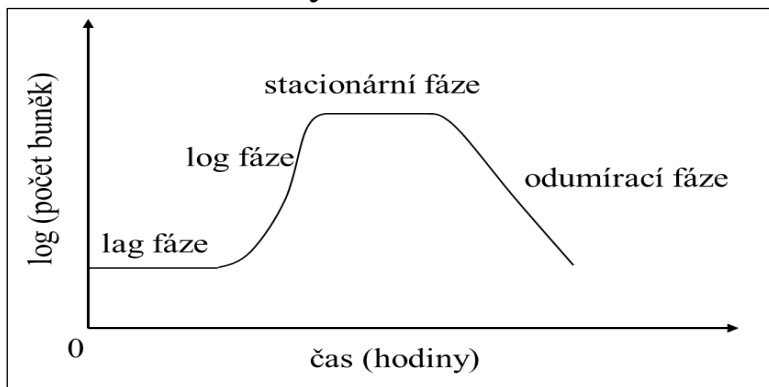


**Legenda:** Schéma inverzního fluorescenční mikroskopu Olympus IX70. Převzato z:  
<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/ix70fluorescence.html> (cit. 3.2.2014)

Experimentální podmínky: mikrofotografie vzorků o rozlišení 4800 x 3600 pixelů byly pořízeny pomocí Olympus DP73 s CCD detektorem a zpracovány byly v programu Olympus Stream Basic 1.7. Mikrofotografie buněk osvětlených bílým světlem byly pořízeny při době expozice 2,2 ms a při citlivosti ISO 200. Mikrofotografie buněk s fluoreskujícím doxorubicinem byly pořízeny za následujících podmínek: excitační filtr 520-550 nm, emisní filtr 580 nm, doba expozice 530,8 ms a citlivost ISO 100.

# Princip stanovení $IC_{50}$ pomocí růstových křivek

- Růstové křivky vyjadřují závislost počtu buněk, případně relativního růstu buněk, na čase.
- Počet buněk se zjišťuje různými metodami, nejčastěji však měřením zákalu kultivačního média, mikroskopicky nebo pomocí průtokové cytometrie.
- Při zjišťování antimikrobiálního účinku látky na danou bakteriální kulturu se ze změřeného počtu bakteriálních buněk vytvoří grafy viability, které reprezentují závislost procenta viability buněk na koncentraci dané látky.
- Funkční závislost se zjistí regresní metodou nejmenších čtverců a ze získané regresní rovnice se vypočítá střední inhibiční koncentrace látky ( $IC_{50}$ ) v 50% viability buněk.



**Legenda:** Popis růstové křivky

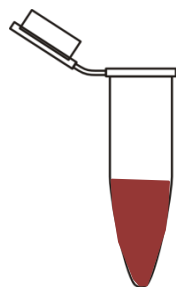
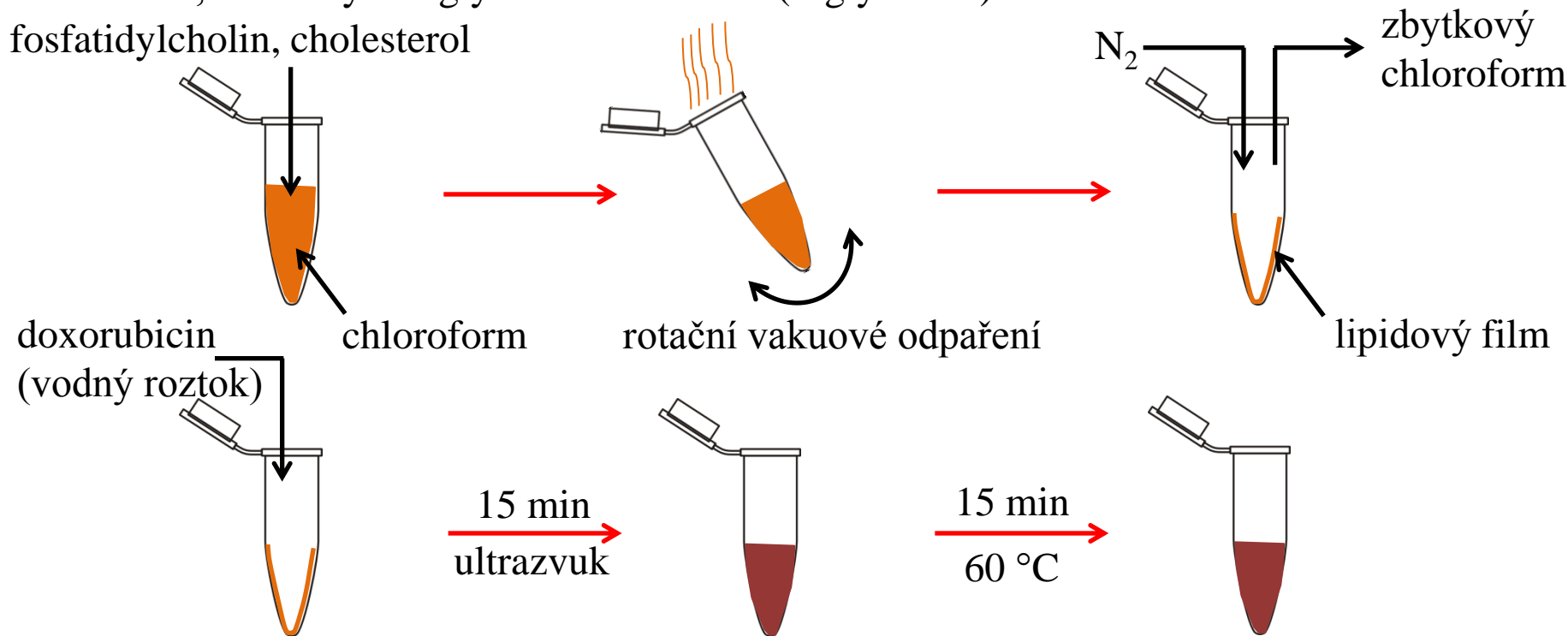


**Legenda:** Multiskan EX



# Příprava liposomů

sodná sůl 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfo-*rac*-(1-glycerolu)  
fosfatidylcholin, cholesterol

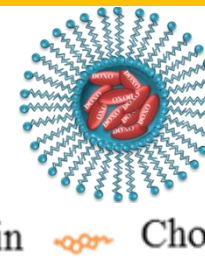
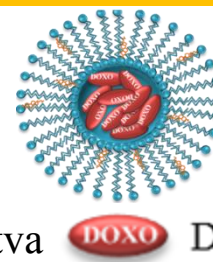
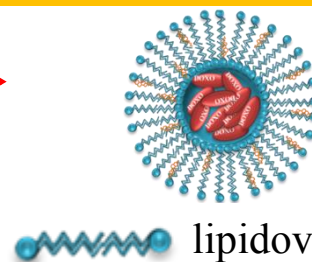


Amicon 3k  
promyto  
vybraným puřem

Liposom 8 (100 mg cholesterolu)

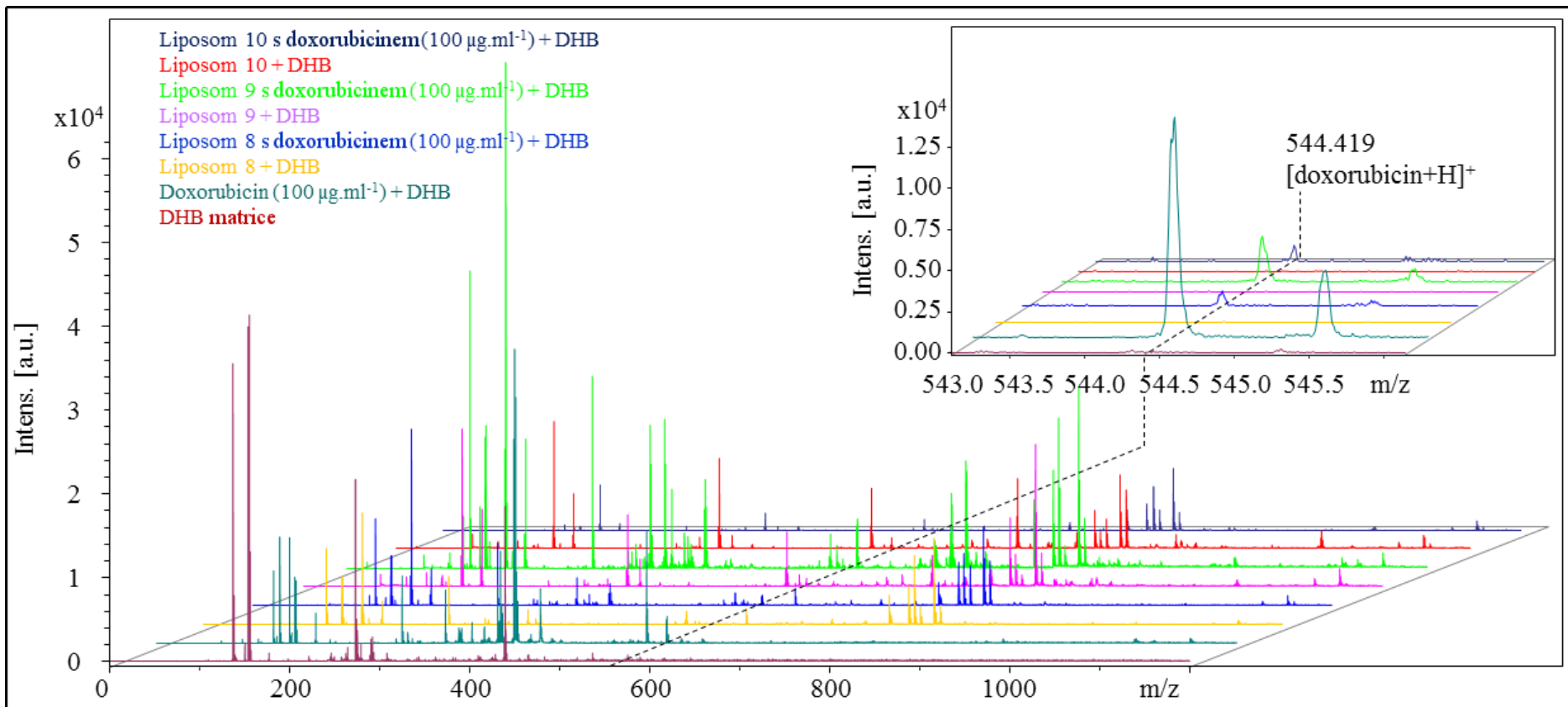
Liposom 9 (50 mg cholesterolu)

Liposom 10 (bez cholesterolu)



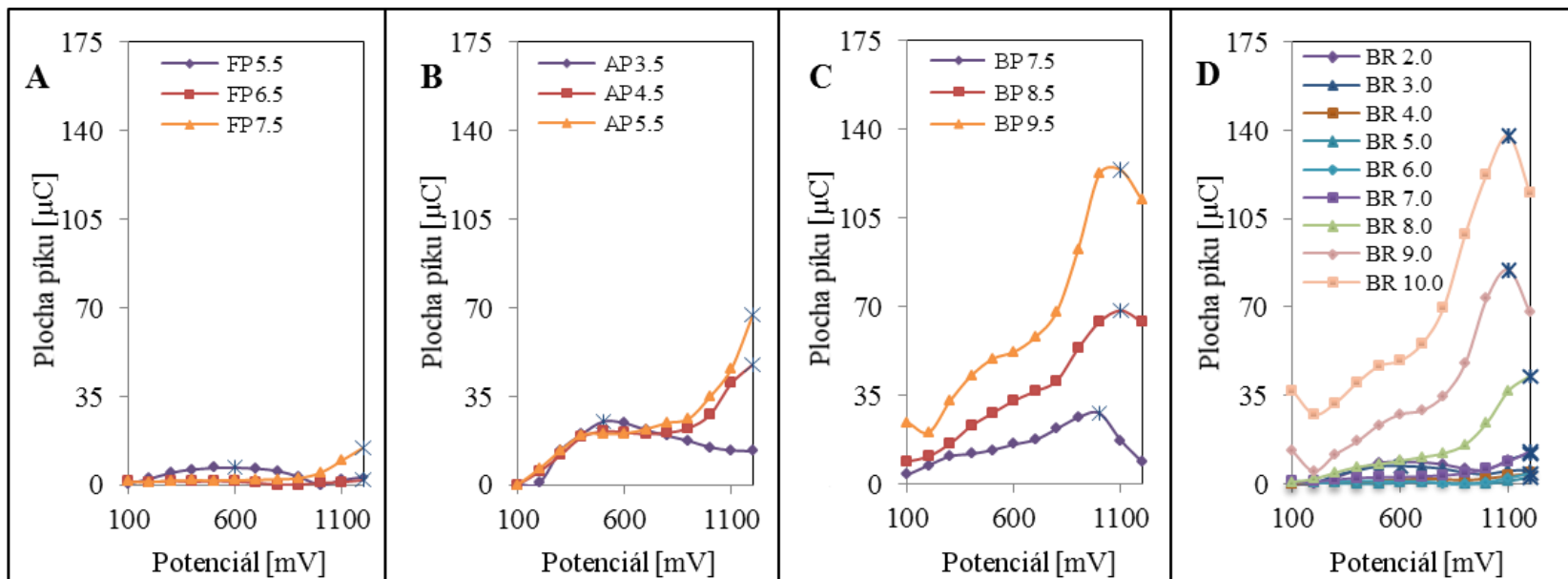
lipidová dvojvrstva DOXO Doxorubicin Cholesterol

# Ověření přítomnosti doxorubicinu pomocí MALDI-TOF



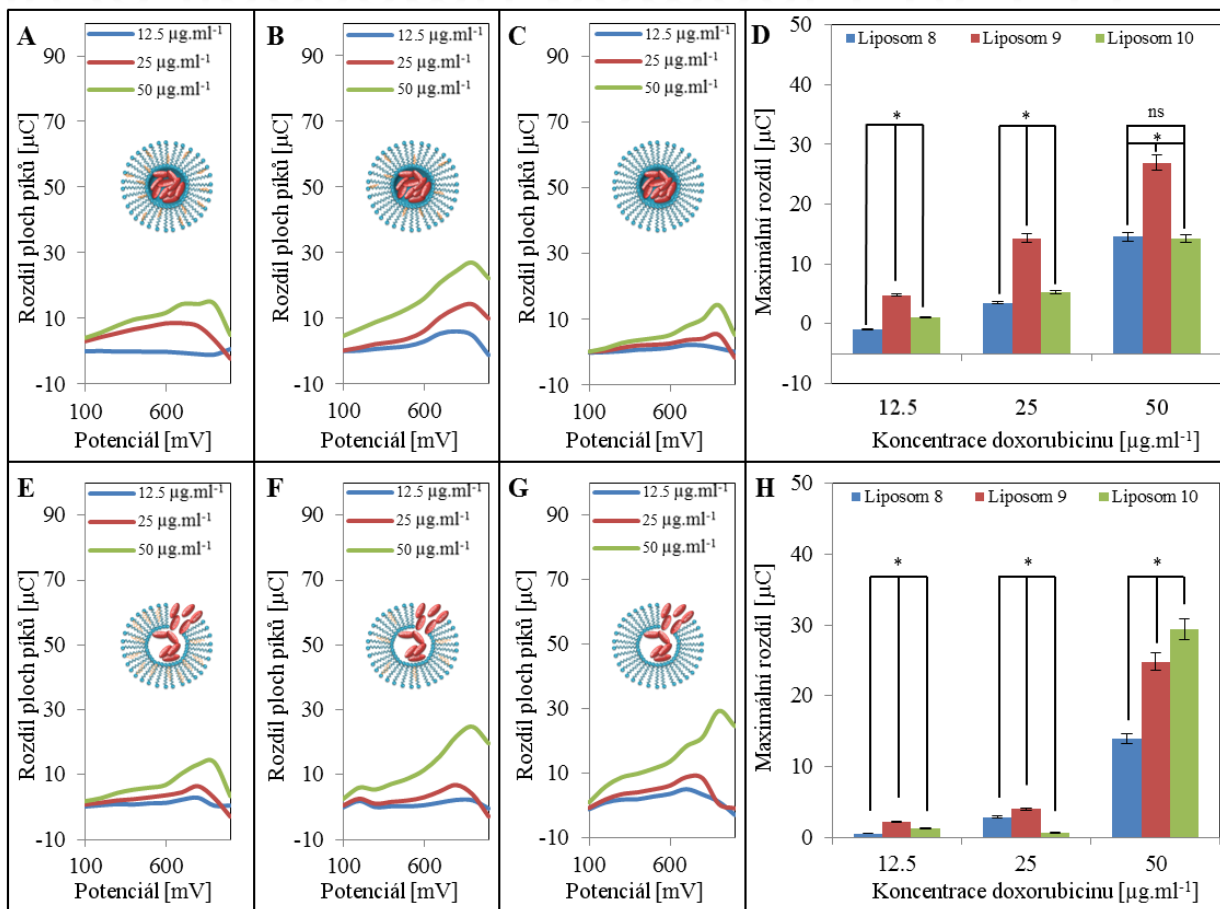
**Legenda:** Hmotnostní spektra odpovídají samotné DHB matrici, matrici s doxorubicinem a matrici s liposomy 8, 9 a 10 s uzavřeným doxorubicinem i bez doxorubicinu. Koncentrace doxorubicinu byla 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Reflektorový pozitivní mód; jedno hmotnostní spektrum bylo vytvořeno zprůměrováním 500 subspekter; výkon laseru byla nastavena 5 % nad prahovou hodnotu.

# Optimalizace podmínek FIA-ED



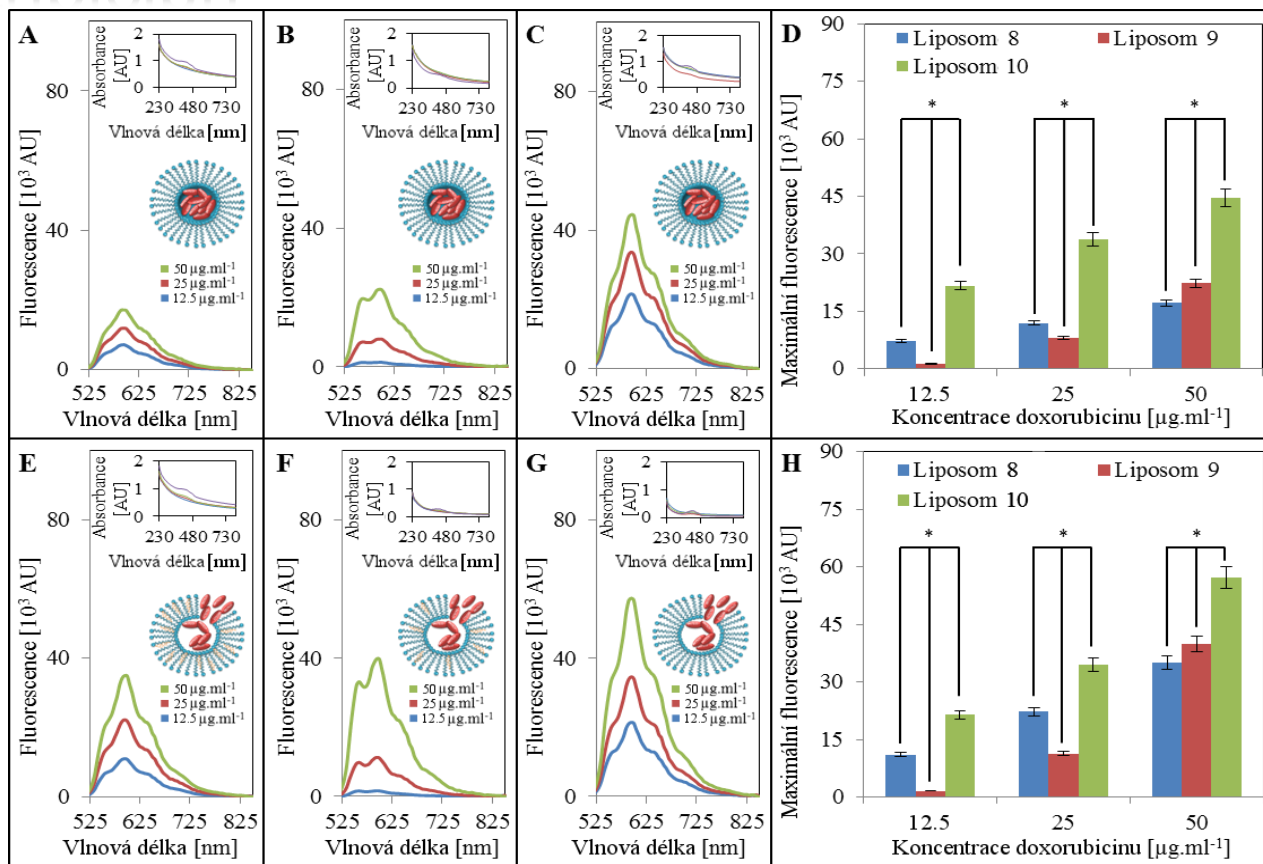
**Legenda:** Závislost plochy píku doxorubicinu ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) na potenciálu pro (A) fosfátový pufr, (B) acetátový pufr, (C) borátový pufr a (D) Britton-Robinson pufr. Hodnoty pH pufrů jsou uvedeny za zkratkou daného pufru. Potenciálový rozsah byl 100-1200 mV se skokem po 100 mV. Dávkováno bylo vždy 20  $\mu\text{l}$  vzorku. Průtok nosného roztoku byl 1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Doxorubicin byl vždy připraven v tom pufru, ve kterém probíhala analýza. Složení pufrů: fosfátový pufr –  $\frac{1}{15}M$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a  $\frac{1}{15}M$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; acetátový pufr – 0,2M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  a 0,2M  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ; borátový pufr – 0,05M  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  a 0,2M  $\text{H}_3\text{BO}_3$  v 0,05M  $\text{NaCl}$ ; Britton-Robinson pufr – 0,04M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 0,04M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 0,04M  $\text{H}_3\text{BO}_3$  a 0,2M  $\text{NaOH}$  pro nastavení pH.  
**Nejlepší podmínky:** Britton-Robinson pufr o pH 10.0.

# Analýza liposomů pomocí FIA-ED



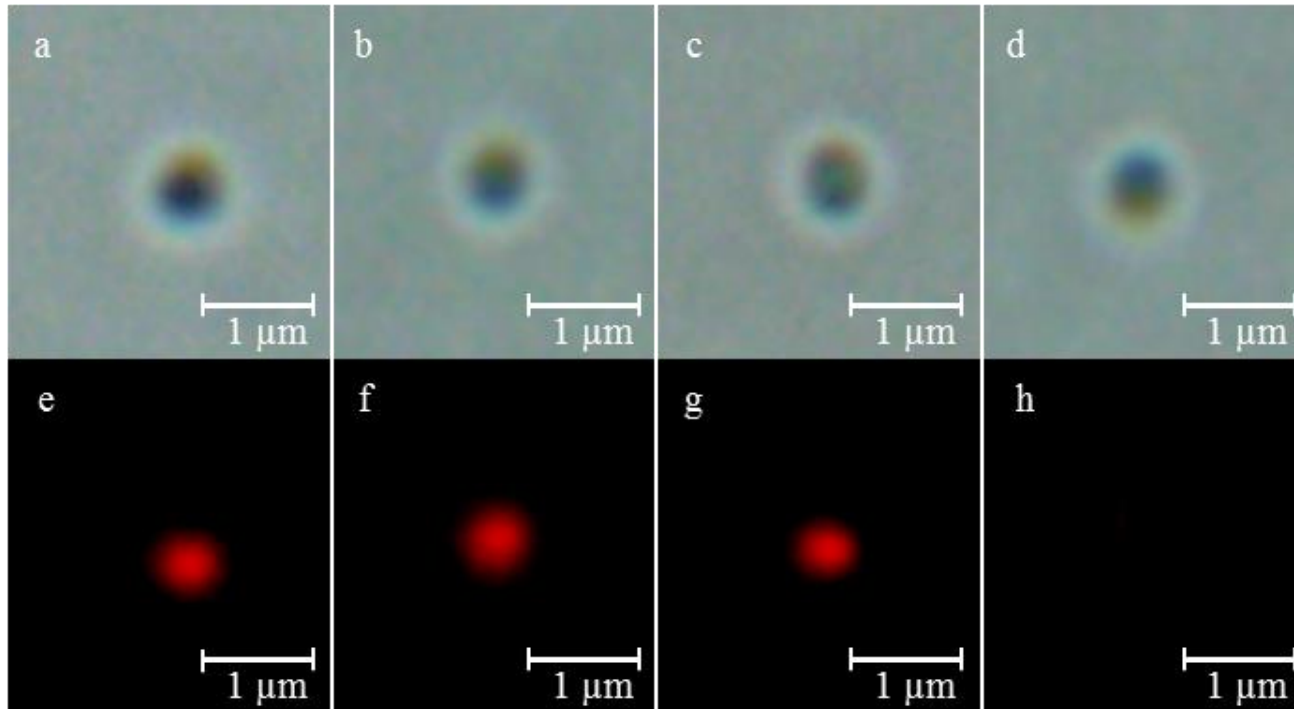
**Legenda:** Diferenční HDV pro liposomy s přidavkem ACS vody v poměru 1:1 (A-C) a diferenční HDV pro liposomy s přidavkem 30 mM SDS v poměru 1:1 (E-G). (A,E) Liposom 8, (B,F) liposom 9 a (C,G) liposom 10. (D) Maximální rozdíly ploch píků z diferenčních HDV liposomů 8, 9 a 10 s přidavkem ACS vody. (H) Maximální rozdíly ploch píků z diferenčních HDV liposomů 8, 9 a 10 s přidavkem 30 mM SDS. Diferenční HDV byly vytvořeny odečtením ploch píků blanku (liposom bez doxorubicinu) od ploch píků vzorku. Potenciálový rozsah byl 100-1000 mV se skokem po 100 mV. Dávkováno bylo vždy 20 µl vzorku. Průtok nosného roztoku byl 1 ml.min<sup>-1</sup>. (\*) statisticky významné rozdíly průměrů na hladině významnosti  $\alpha = 0.05$ . (ns) not significant statisticky nevýznamné rozdíly průměrů.

# Fluorescenční analýza liposomálního doxorubicinu



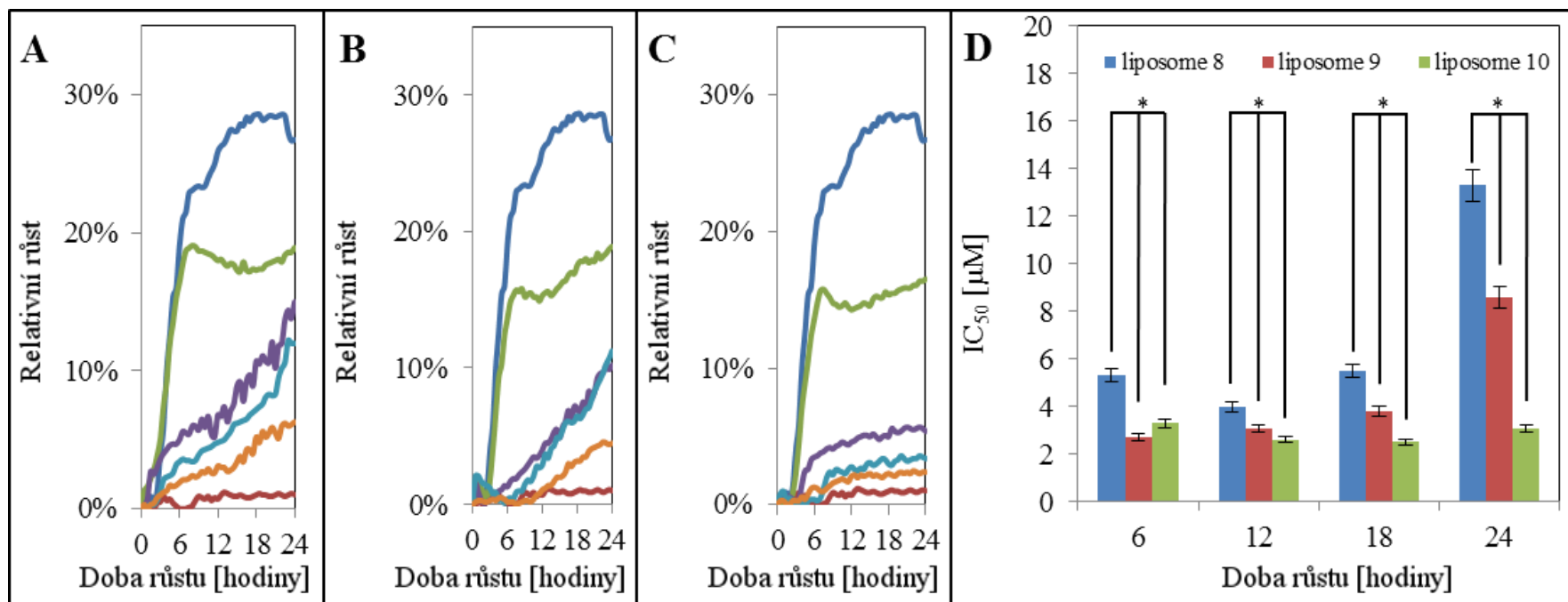
**Legend:** Fluorescenční a absorpční (vložené grafy) spektra pro liposomy 8 (A,E), 9 (B,F) a 10 (C,G). (A-C) liposomy s přidavkem ACS vody v poměru 1:1. (E-G) liposomy s přidavkem 30 mM SDS v poměru 1:1. (D) Maximální fluorescence pro liposomy 8, 9 a 10 s přidavkem ACS vody. (H) Maximální fluorescence pro liposomy 8, 9 a 10 s přidavkem 30 mM SDS. Do 96jamkové UV-propustné destičky bylo pipetováno vždy 50  $\mu\text{l}$  vzorku. Absorpční sken byl proveden v rozmezí 230-800 nm po 5 nm. Fluorescenční sken byl proveden v rozmezí 510-850 nm po 5 nm; excitační záření mělo vlnovou délku 480 nm. (\*) statisticky významné rozdíly průměrů na hladině významnosti  $\alpha = 0.05$ .

# Ověření transportu liposomálního doxorubicinu do buněk zlatého stafylokoka pomocí fluorescenční mikroskopie



**Legenda:** Mikrofotografie buněk zlatého stafylokoka po inkubaci s liposomálním doxorubicinem ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Při bílém světle (**a-d**) a při fluorescenci doxorubicinu (**e-h**). (**a,e**) Liposom 8, (**b,f**) liposom 9, (**c,g**) liposom 10 a (**d,h**) samostatná buňka zlatého stafylokoka. Excitační filtr 520-550 nm a emisní filtr 580 nm. Doba expozice při bílém světle byla 2,2 ms při citlivosti ISO 200. Při fluorescenci byla doba expozice 530,8 ms při citlivosti ISO 100.

# Růstové křivky a stanovení IC<sub>50</sub>



**Legenda:** Všechny grafy obsahují růstové křivky zlatého stafylokoka s doxorubicinem (100 μg.ml<sup>-1</sup>, červená křivka) a samostatného zlatého stafylokoka (tmavomodrá křivka). (A) Růstové křivky bakteriální kultury s doxorubicinem uzavřeným v liposomu 8. (B) Růstové křivky bakteriální kultury s doxorubicinem uzavřeným v liposomu 9. (C) Růstové křivky bakteriální kultury s doxorubicinem uzavřeným v liposomu 10. (D) Hodnoty IC<sub>50</sub> pro doxorubicin uzavřený v liposomech 8, 9 a 10. Koncentrace doxorubicinu v liposomech byla 0 (olivovězelená křivka); 12,5 (fialová křivka); 25,0 (azurověmodrá křivka) a 50,0 (oranžová křivka) μg.ml<sup>-1</sup> – to je 0,0; 23,0; 46,0 a 92,0 μM po přepočtu. Měření absorbance probíhalo každých 30 minut v intervalu 0-24 hodin při 620 nm a při 37 °C. (\*) statisticky významné rozdíly průměrů na hladině významnosti α = 0.05.

# Shrnutí

- Byl využit nový přístup pro vyjádření elektrochemické detekce liposomálního doxorubicinu, když byly zkonstruovány diferenční hydrodynamické voltamogramy.
- Cholesterol ovlivňuje elektrochemickou detekci liposomálního doxorubicinu tím způsobem, že pravděpodobně podporuje přenos elektronu přes lipidovou dvojvrstvu liposomu.
- Fluorescence liposomálního doxorubicinu byla nejvyšší u liposomu 10 a bylo zjištěno, že po přidavku 30 mM SDS spolehlivě došlo k uvolnění doxorubicinu u všech testovaných liposomů.
- Toxicita liposomálního doxorubicinu je závislá na koncentraci cholesterolu v lipidové dvojvrstvě liposomů. Hodnoty  $IC_{50}$  byly nejvyšší u doxorubicinu v liposomu 8 a nejnižší byly u doxorubicinu v liposomu 10 (rozdíl byl až 4x).
- Všechny cíle byly splněny.

# Publikace

- **Guráň, R.**, M. Komínková, et al. (2013). “Liposomes as drug carriers and their characterization using different analytical methods”. MendelNet 2013 - International PhD Students Conference, Brno, Czech republic, Mendel University in Brno.
- Kominkova, M., **R. Guran**, et al. (2014). “Study of Functional Qualities of Different Types of Tailored Liposomes with Encapsulated Doxorubicin using Electrochemical and Optical Methods”. International Journal of Electrochemical Science **9**. (in press)



# Poděkování

- Mgr. Ondřej Zítka, Ph.D.; Mgr. Karel Novotný, Ph.D.; doc. RNDr. Pavel Kopel, Ph.D.; Lukáš Melichar; Mgr. Bc. Markéta Komínková; Ing. Iva Blažková; Ing. Lukáš Nejdli; Mgr. Dagmar Chudobová a prof. Ing. René Kizek, Ph.D.
- Všem kolegům z Laboratoře metalomiky a nanotechnologií (Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova Univerzita v Brně)



# Děkuji Vám za pozornost

Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.4.00/31.0023

Název projektu: Partnerská síť centra excelentního bionanotechnologického výzkumu