


  
 INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

---

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

Školitel: Roman Guráň

Datum: 6.2.2014

Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.4.00/31.0023  
 Název projektu: Partnerská síť centra excelentního bionanotechnologického výzkumu




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---


  
 INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

---

**Cíle práce**

- Vpracovat 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 dodecylsiranu 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 kulturu zlatého stafylokoka.

Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.4.00/31.0023  
 Název projektu: Partnerská síť centra excelentního bionanotechnologického výzkumu




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---


  
 INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

---

**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).

Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.4.00/31.0023  
 Název projektu: Partnerská síť centra excelentního bionanotechnologického výzkumu




---

---

---

---

---


---

---

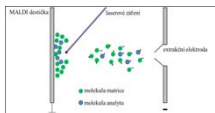
---

---


---


  
**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:



**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 piků 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 μJ a opakovací frekvencí 2000 Hz, fokuse laseru na průměr až 10 μm.

---

---

---

---

---


---

---

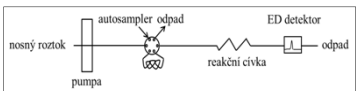
---

---

---


  
**FIA-ED analýza liposomálního doxorubicinu**

- FIA = flow injection analysis = průtoková injekční analýza
- FIA umožňuje automatizované měření sady vzorků, řídí reakce analytů s činidly i např. zapojit více detektorů v sérii nebo paralelně.
- Výsledky ve formě diferenciálních hydrodynamických voltamogramů (pojato jako závislost rozdílu ploch piků – 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 μl; průtok nosného roztoku byl 1 ml.min<sup>-1</sup>; 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 přidávku 30 mM SDS.



**Legenda:** Tecan Infinite M200 PRO

Experimentální podmínky: měření v UV-propustné 96jamkové destičce, pipetováno vždy 50 μl 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 absorpance pomocí křemíkové fotodiody.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

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

**Legenda:** Schéma inverzního fluorescenčního 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<sub>50</sub> 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 změněného 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<sub>50</sub>) 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

doxorubicin (vodný roztok) + chloroform

rotační vakuové odpaření

lipidový film

15 min ultrazvuk

15 min 60 C

**Liposom 8** (100 mg cholesterolu)

**Liposom 9** (50 mg cholesterolu)

**Liposom 10** (bez cholesterolu)

Amicon 3k promyto vybraným puřmem

lipidová dvojvrstva    Doxorubicin    Cholesterol

---

---

---

---

---

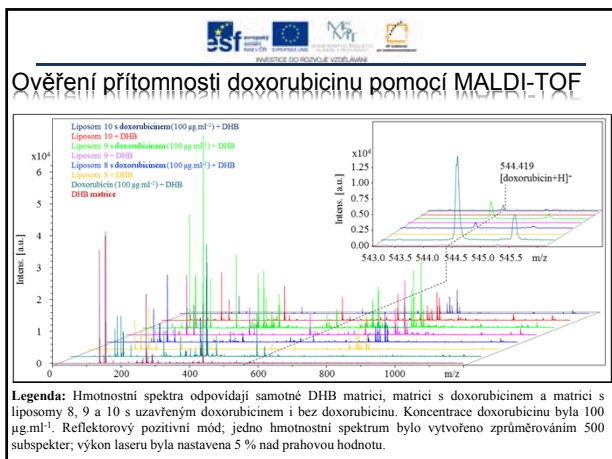
---

---

---

---

---



**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 µg ml<sup>-1</sup>. Reflektorový pozitivní mód; jedno hmotnostní spektrum bylo vytvořeno průměrováním 500 subspekter; výkon laseru byla nastavena 5 % nad prahovou hodnotu.

---

---

---

---

---

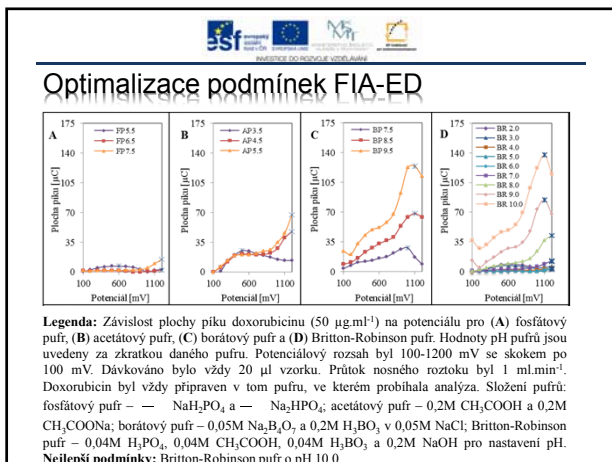
---

---

---

---

---



**Legenda:** Závislost plochy piku doxorubicinu (50 µg ml<sup>-1</sup>) na potenciálu pro (A) fosfátový pufr, (B) acetaťový 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 µl vzorku. Průtok nosného roztoku byl 1 ml min<sup>-1</sup>. Doxorubicin byl vždy připraven v tom pufru, ve kterém probíhala analýza. Složení pufrů: fosfátový pufr – NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; acetaťový pufr – 0,2M CH<sub>3</sub>COOH a 0,2M CH<sub>3</sub>COONa; borátový pufr – 0,05M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> a 0,2M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> v 0,05M NaCl; Britton-Robinson pufr – 0,04M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0,04M CH<sub>3</sub>COOH, 0,04M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> a 0,2M NaOH pro nastavení pH. **Nelepší podmínky:** Britton-Robinson pufr o pH 10,0.

---

---

---

---

---

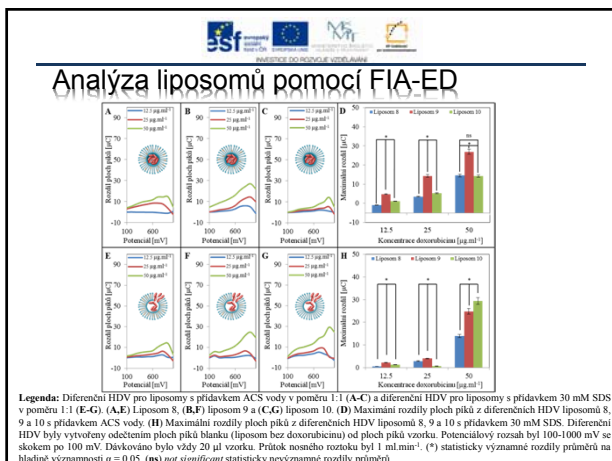
---

---

---

---

---



**Legenda:** Diferenční HDV pro liposomy s přidávkou ACS vody v poměru 1:1 (A-C) a diferenční HDV pro liposomy s přidávkou 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 piků z diferencních HDV liposomů 8, 9 a 10 s přidávkou ACS vody. (H) Maximální rozdíly ploch piků z diferencních HDV liposomů 8, 9 a 10 s přidávkou 30 mM SDS. Diferenční HDV byly vytvořeny odečtením ploch piků blanku (liposom bez doxorubicinu) od ploch piků 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.

---

---

---

---

---

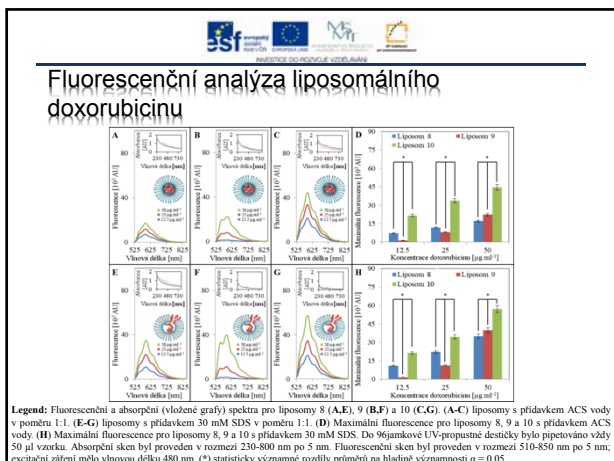
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

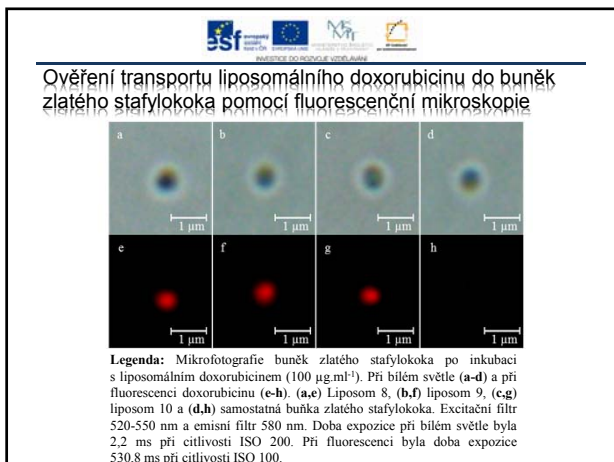
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

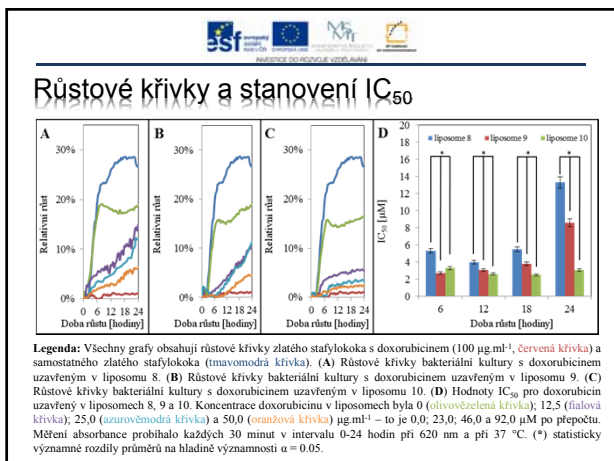
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

  
 INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

---

## 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

- Guráš, 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.
- Komínková, M., R. Gurán, 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)

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

  
 INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

---

## 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 Nejdí; 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)



Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.4.00/31.0023  
 Název projektu: Partnerská síť centra excelentního bionanotechnologického výzkumu 

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

  
 INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

---

## Děkuji Vám za pozornost

Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.4.00/31.0023  
 Název projektu: Partnerská síť centra excelentního bionanotechnologického výzkumu 

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---