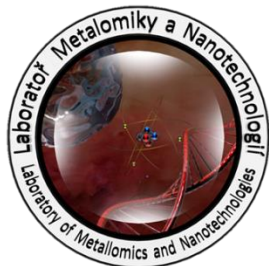


Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií



Stanovení olovnatých iontů zapouzdřených v liposomech The determination of lead ions encapsulated in liposomes

Anotace

Olovo je těžký kov, který je toxický i při velmi nízkých dávkách a má akutní a chronické účinky na lidské zdraví. Vykazuje multi-systémovou tkáňovou toxicitu, která může způsobit neurologické, kardiovaskulární, renální, gastrointestinální, hematologické, reprodukční, genotoxické a karcinogenní účinky [1]. Stanovení stopových prvků v krvi a tělních tekutinách je v medicíně stále důležité. Díky uvedeným negativním vlastnostem olova, je třeba sledovat jeho množství v organismu [2]. Liposomy jsou sférické nanočástice složené z lipidových dvouvrstev, které uzavřou vodnou fázi. Lze je snadno připravit a jsou stabilní v roztoku po dlouhou dobu, aniž by došlo k významným změnám ve velikosti a struktuře [3]. Cílem této studie byla příprava liposomu se zapouzdřenými olovnatými ionty, které byly zjištěny pomocí elektrochemických metod. Zaměřili jsme se na potenciální využití elektrochemické metody pro stanovení volného olova a olova zapouzdřeného v liposomu a stanovení účinnosti zapouzdření na toxicitu olova. To je založeno na redoxní změně vnitřního prostředí organismu. Je prokázáno, že ionty těžkých kovů způsobují inhibici růstu mikroorganismů (bakterií), a proto jsou často zahrnuty do různých druhů materiálů vykazujících antimikrobiální aktivitu [4]. Metoda růstových křivek slouží jako nástroj pro vyhodnocení antimikrobiální aktivity, například vliv těžkých kovů na bakteriální kmeny, jako je *Staphylococcus aureus* v tomto experimentu [5].

Použitý materiál (vše od Sigma-Aldrich)

- cholesterol
- sodná sůl derivátu glycerolu
- chloroform
- $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$
- ACS voda
- trihydrát octanu sodného ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$)
- koncentrovaná kyselina octová (CH_3COOH)



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Pracovní postup

ZAPOUZDŘENÍ OLOVA DO LIPOSOMU

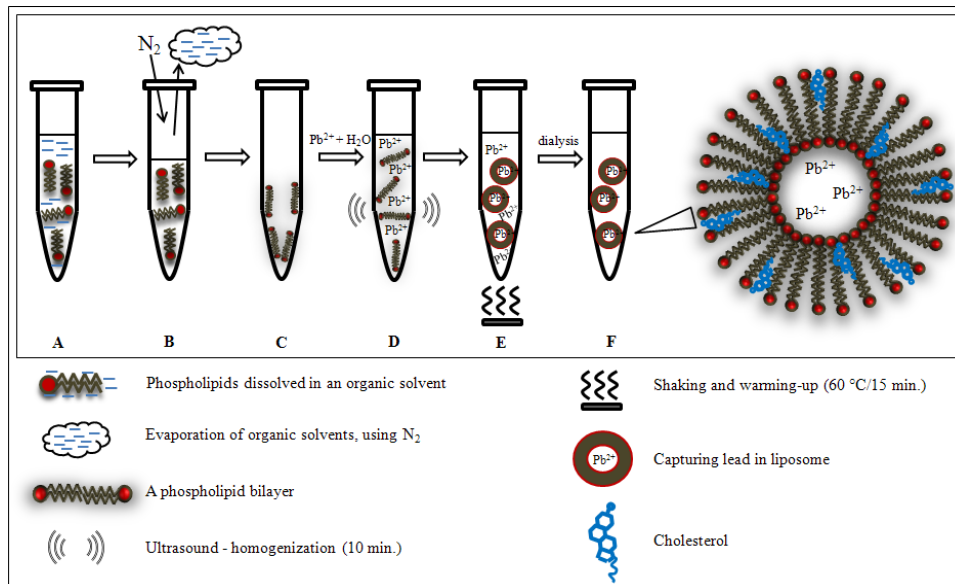


Schéma zapouzdření olova do struktury liposomu: (A) Fosfolipidy se rozpustí v chloroformu. Po odpaření rozpouštědla pomocí dusíku (B), získáme film lipidů zachycený na stěnách zkumavky (C). (D) Roztok olova se přidá k fosfolipidové dvojvrstvě a vzorky budou homogenizovány po dobu 10 minut za použití ultrazvuku (E). Homogenizovaná směs bude zahřívána a třepána po dobu 15 minut při teplotě 60 °C v Thermomixer Comfort (Eppendorf). (F) Nezachycené ionty olova budou odstraněny z roztoku dialýzou.

PŘÍPRAVA ACETÁTOVÉHO PUFRU

Navážíme 27,22 g CH₃COONa·3 H₂O a rozpustíme do 1 litru ACS H₂O, přidavkem kyseliny octové (CH₃COOH) upravíme na požadované pH 5,0.

ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ

Diferenční pulzní voltametrie (DPV)

Olovo bude stanoveno pomocí DPV. Měření bude prováděno na měřicím zařízení 746 VA Trace analyser (Metrohm, Švýcarsko) propojeném s 695 Autosampler (Metrohm, Švýcarsko). Data budou vyhodnocena pomocí VA Database 2.2 (Metrohm, Švýcarsko). Bude použito tříelektrodové zapojení. Jako pracovní elektroda bude použita visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4 mm², jako referenční elektroda Ag/AgCl/3M KCl a pomocná uhlíková. Základní elektrolyt (acetátový pufr pH 5,0) bude pro každý měřený vzorek vyměněn. Parametry DPV jsou následující: počáteční potenciál -1.2 V, konečný potenciál 0.15 V, depozitní potenciál -1.2 V, depozice 480 s, probublávání argonem 60 s, intervalový čas 0.05 s, potenciálový krok 5 mV, modulační amplituda 25 mV. K analýze bude použito 25 μl vzorku, smíchaného společně s 1975 μl acetátového pufru v měrné nádobce v celkovém objemu 2 ml.

Cyklická voltametrie (CV)

Olovo bude stanoveno pomocí CV. Měření bude prováděno na měřicím zařízení with 797 VA Computrace (Metrohm, Švýcarsko) propojeném s 813 Compact Autosampler (Metrohm, Švýcarsko). Data budou vyhodnocena pomocí softwaru 797 VA Computrace (Metrohm, Švýcarsko). Bude použito tříelektrodové zapojení. Jako pracovní elektroda bude použita visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4 mm², jako referenční elektroda Ag/AgCl/3M KCl a pomocná platinová. Základní elektrolyt (acetátový pufr pH 5,0) bude pro každý měřený vzorek vyměněn. Parametry DPV jsou následující: počáteční i koncový potenciál: -1.2 V, (-1.2 - 0.15 V), rychlost skenu 50 – 800 mV/s, depoziční potenciál -1.2 V, depozice 480 s, probublávání argonem 60 s. K analýze bude použito 25 µl vzorku, smíchaného společně s 1975 µl acetátového pufru v měrné nádobce v celkovém objemu 2 ml.

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) – zvolena jako srovnávací metoda k elektrochemickému stanovení

Stanovení olova bude provedeno na AAS 240FS Agilent Technologies (Agilent, USA) s plamenovou atomizací. Proud lampy bude 10 mA. Olovo bude měřeno při vlnové délce 217,0 nm, spektrální šířka pásma 1,0 nm. Na atomizaci plamenem bude použita směs vzduchu a acetylenu. Bude použita deuteriová korekce pozadí a signál bude měřen v integračním režimu 2 s.

STANOVENÍ TOXICITY VOLNÝCH IONTŮ OLOVA A OLOVA ZAPOUZDŘENÉHO DO LIPOSOMU

Toxicita volných iontů olova a olova zapouzďřeného do liposomu byla sledována pomocí bakteriálního kmene *S. aureus*.

Postup pro vyhodnocení antimikrobiálního účinku testovaných látek bude pomocí měření absorbance na přístroji Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific, Německo) a následného vyhodnocení v podobě růstových křivek. 24 hodin pěstované kultury *S. aureus* budou zředěny LB médiem (10 g tryptonu, 5 g kvasinkového extraktu, 5 g NaCl/1 l deionizované vody) za použití spektrofotometru SPECORD 210 (Analytik Jena, Německo) při vlnové délce 600 nm a absorbance 0,1. Kultury *S. aureus* se v mikrotitrační destičce smísí s různými koncentracemi olova (volné inty olova, olovo zapouzďřené do liposomu), nebo samotný kmen *S. aureus* pro kontrolní měření. Koncentrace olova budou 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200 a 250 µM. Celkový objem jamek mikrotitrační destičky bude vždy 300 µl. Měření bude provedeno v čase 0, pak každých 30 minut po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C, při vlnové délce 620 nm. Dosažené hodnoty budou analyzovány v grafické podobě jako růstové křivky pro každou variantu samostatně.

VÝSLEDKY

Obrázek 1: Elektrochemické signály olova. Olovo bylo stanoveno metodou DPV. Jako elektrolyt byl použit 0,2 M acetátový pufr pH 5. Charakteristický pík olova je v potenciálu



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE

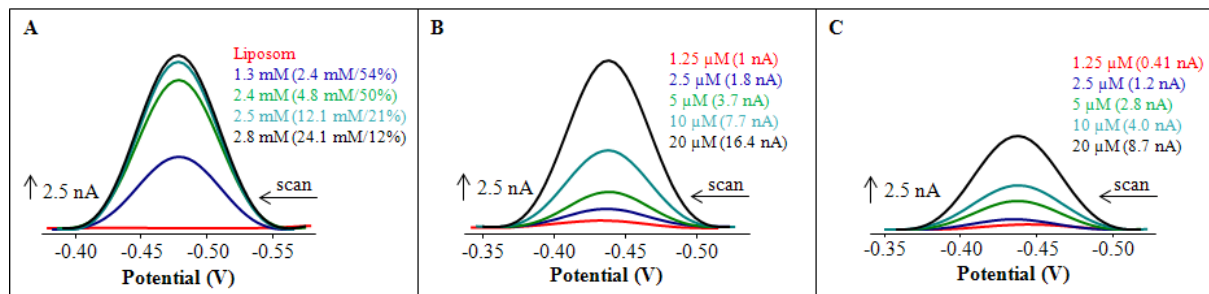


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

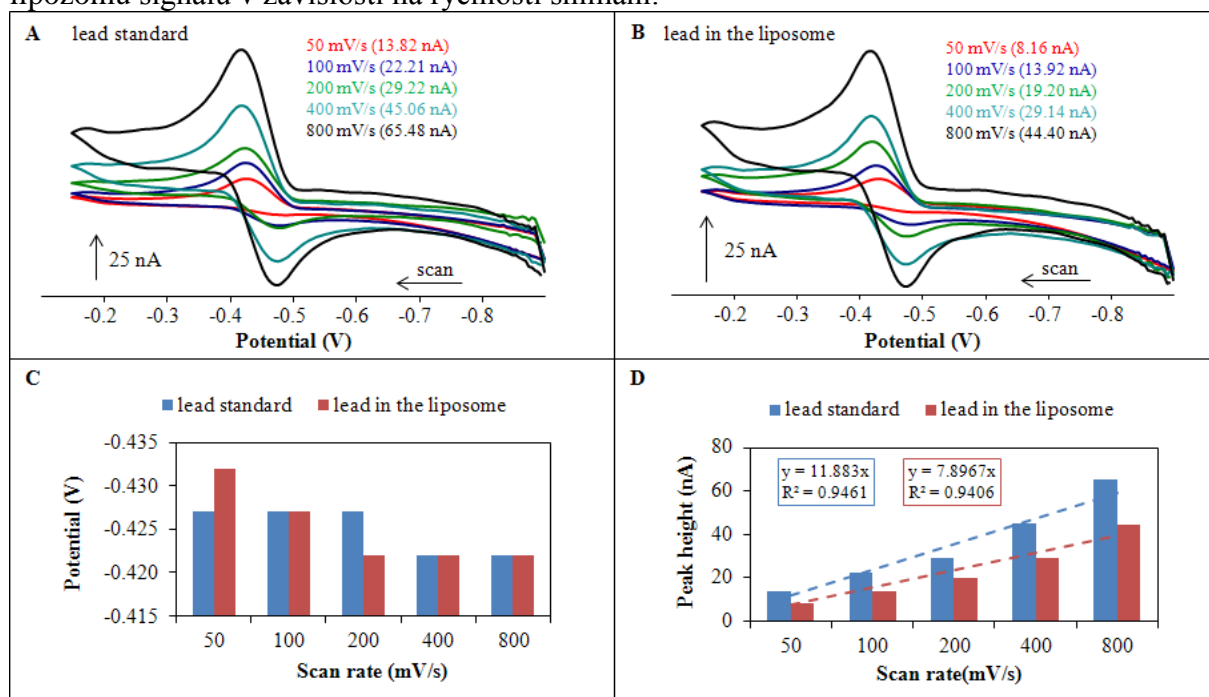


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

-0,45 V. (A) Voltamogramy olova zapouzdřeno v liposomu s koncentračním rozmezí 0-2,8 mM (aplikovaná koncentrace/procento zachycení), (B) Voltamogramy standardu olova s koncentračním rozmezí 1,25 - 20 μ M, (C) Voltamogramy olova zapouzdřeného v liposomu s koncentračním rozmezí 1,25 až 20 μ M.

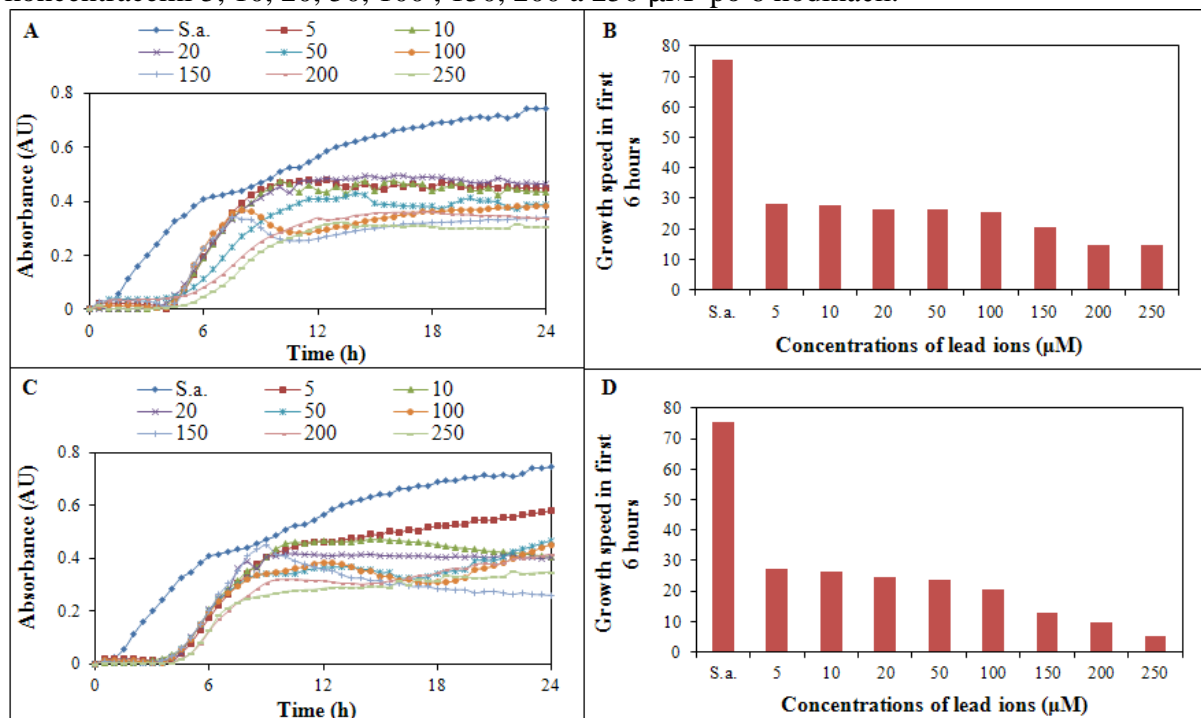


Obrázek 2: Elektrochemické signály olova. Olovo bylo stanoveno metodou CV s různou rychlostí snímání (50-800 mV/s). Jako elektrolyt byl použit 0,2 M acetátový pufr pH 5. Charakteristický pík olova je v potenciálu -0,45 V. (A) Voltamogramy standardu olova s koncentrací 20 μ M, (B) Voltamogramy olova v liposomu s koncentrací 20 μ M, (C) Změna polohy píku olova a píku olova zapouzdřeného v liposomu v závislosti na použité rychlosti snímání. (D) Lineární závislost výšky píku standardu olova a olova zapouzdřeného v liposomu signálů v závislosti na rychlosti snímání.



Obrázek 3: Spektrofotometrická analýza růstu *S. aureus* s různými koncentracemi olova. (A), růstové křivky bakteriální kultury *S. aureus* s různými koncentracemi olova bez liposomu, (B) spektrofotometrická analýza růstu bakteriální kultury *S. aureus* s ionty olova s koncentracemi

5, 10, 20, 50, 100, 150, 200 a 250 μM po 6 hodinách, (C), růstové křivky bakteriální kultury *S. aureus* s různými koncentracemi olova zapouzdřených v liposomu, (D) spektrofotometricky analýza růstu bakteriální kultury *S. aureus* s ionty olova s koncentracemi 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200 a 250 μM po 6 hodinách.



Obrázek 4: Inhibiční koncentrace iontů olova a olova zapouzdřeného v liposomu v průběhu čtyř různých časů.

Pb without liposome - Abs. 6h	1.0 μM	Pb in liposome - Abs. 6h	137.5 μM
Pb without liposome - Abs. 12 h	29.1 μM	Pb in liposome - Abs. 12 h	198.7 μM
Pb without liposome - Abs. 18 h	1.0 μM	Pb in liposome - Abs. 18 h	1.0 μM
Pb without liposome - Abs. 24 h	1.0 μM	Pb in liposome - Abs. 24 h	1.0 μM

Liposomy se jeví jako vhodný nosič různých látek prostřednictvím vnitřní dutiny. Vzhledem ke struktuře liposomu je usnadněn jeho vstup do buněk, ale toxicita zapouzdřeného olova je nižší ve srovnání s volnými ionty olova.



Doporučená literatura

- [1] ATSDR, (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) *Toxicological profile for lead (update)*. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, 1999.
- [2] Parsons, P.J., *Monitoring human exposure to lead - an assessment of current laboratory performance for the determination of blood lead*. *Environmental Research*, 1992. **57**(2): p. 149-162.
- [3] Vamvakaki, V., D. Fournier, and N.A. Chaniotakis, *Fluorescence detection of enzymatic activity within a liposome based nano-biosensor*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2005. **21**(2): p. 384-388.
- [4] Martinez-Abad, A., et al., *On the different growth conditions affecting silver antimicrobial efficacy on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica**. *International Journal of Food Microbiology*, 2012. **158**(2): p. 147-154.
- [5] Fernandez-Saiz, P., et al., *Effects of chitosan films on the growth of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella spp.* in laboratory media and in fish soup*. *International Journal of Food Microbiology*, 2010. **137**(2-3): p. 287-294.