

Lipidové vezikuly jako nosiče látek s řízeným uvolňováním pomocí vysokofrekvenčního ultrazvuku



Lékařská
fakulta

Autor: Eva Zavřelová, Školitel MUDr. Mgr. Robert Bajgar, Ph.D (Ústav lékařské biofyziky)

Úvod

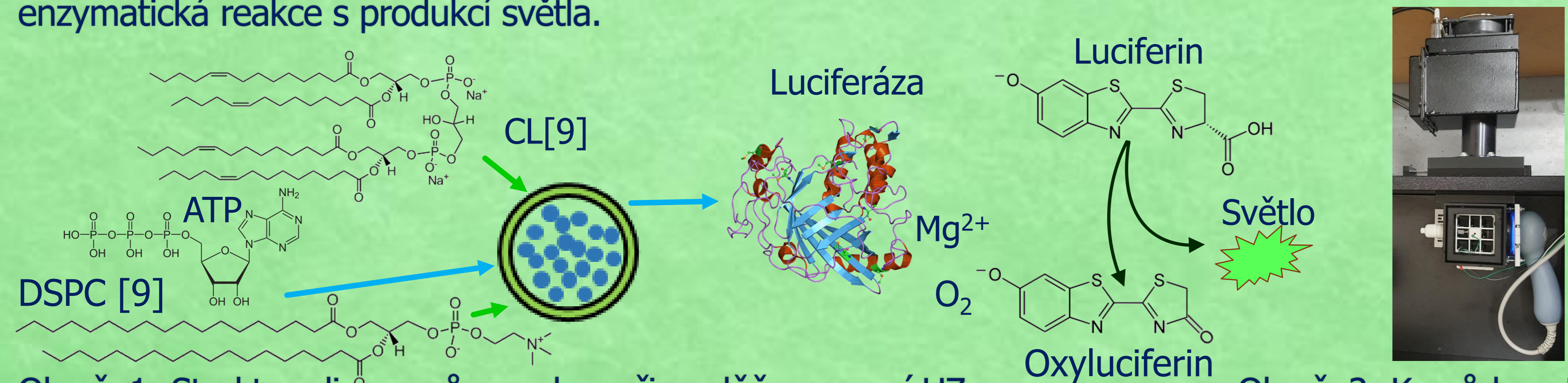
Lipozomy jsou kulaté vezikuly skládající se z jedné nebo více lipidových dvojvrstev obklopující vodnaté centrum [1,2,3]. Biokompatibilita a biodegradace je dána jejich podobností s buněčnými membránami. Nacházejí uplatnění v distribuci léčiv [4,5]. Specifická sestava lipidů použita k vytvoření lipozomů může být jednoduše obměňována, a tím může ovlivňovat jejich vlastnosti jako fluiditu nebo náboj membrány a hydrataci [6,7]. Lipozomy jsou slibné alternativní paradigmaty pro dávkování terapie, jež umožňuje lokální uvolnění léčiva. Ultrazvuk je široce studován jako spouštěč pro uvolňování látek z lipozomů. Nabízející několik výhod, jako například neinvazivitu, možnost zaměření určité tkáně nebo jemné ladění intenzity (popř. frekvence) k získání optimálního uvolňování [8]. V této práci byl použit vysokofrekvenční fyzioterapeutický ultrazvuk o intenzitě 3 W/cm² a frekvenci 1 MHz v pulzním režimu.

Cíl

Návrh měření uvolňování nízkomolekulárních látek z lipozomů pomocí vysokofrekvenčního ultrazvuku.

Materiál a metodika

Pro vytvoření liposomů byl použit distearoylphosphatidylcholin (DSPC) a distearoylphosphatidylcholin s kardiolipinem (DSPC+CL). Uvnitř lipozomů bylo ATP, díky kterému mohla, po jeho uvolnění, proběhnout enzymatická reakce s produkcí světla.



Obr. č. 1: Struktura liposomů a reakce při uvolnění pomocí UZ

Obr. č. 2: Komůrka s UZ

PŘÍPRAVA MULTILAMELÁRNÍCH VEZIKUL

Lipidy se rozpustily v chloroformu o koncentraci 10 mg/ml. Rozpouštědlo se odstranilo proudem plynného dusíku. Po přidání 0,5 ml 10 mM HEPES se vytvořený lipidový film sonifikoval (při 37 kHz) na vodní lázni 5 minut při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 0,5 ml 10 mM HEPES s 60 mM ATP.

PŘÍPRAVA UNILAMELÁRNÍCH VEZIKUL

Unilamelární lipozomy byly připraveny pomocí Avanti miniextruderu při 55 °C. Lipidová směs se jemně protlačila přes polykarbonovou membránu, nejdříve 5x s velikostí pórů 1 μm a poté 5x s póry 0,2 μm.

ODSTRANĚNÍ EXTRAVEZIKULÁRNÍHO ATP

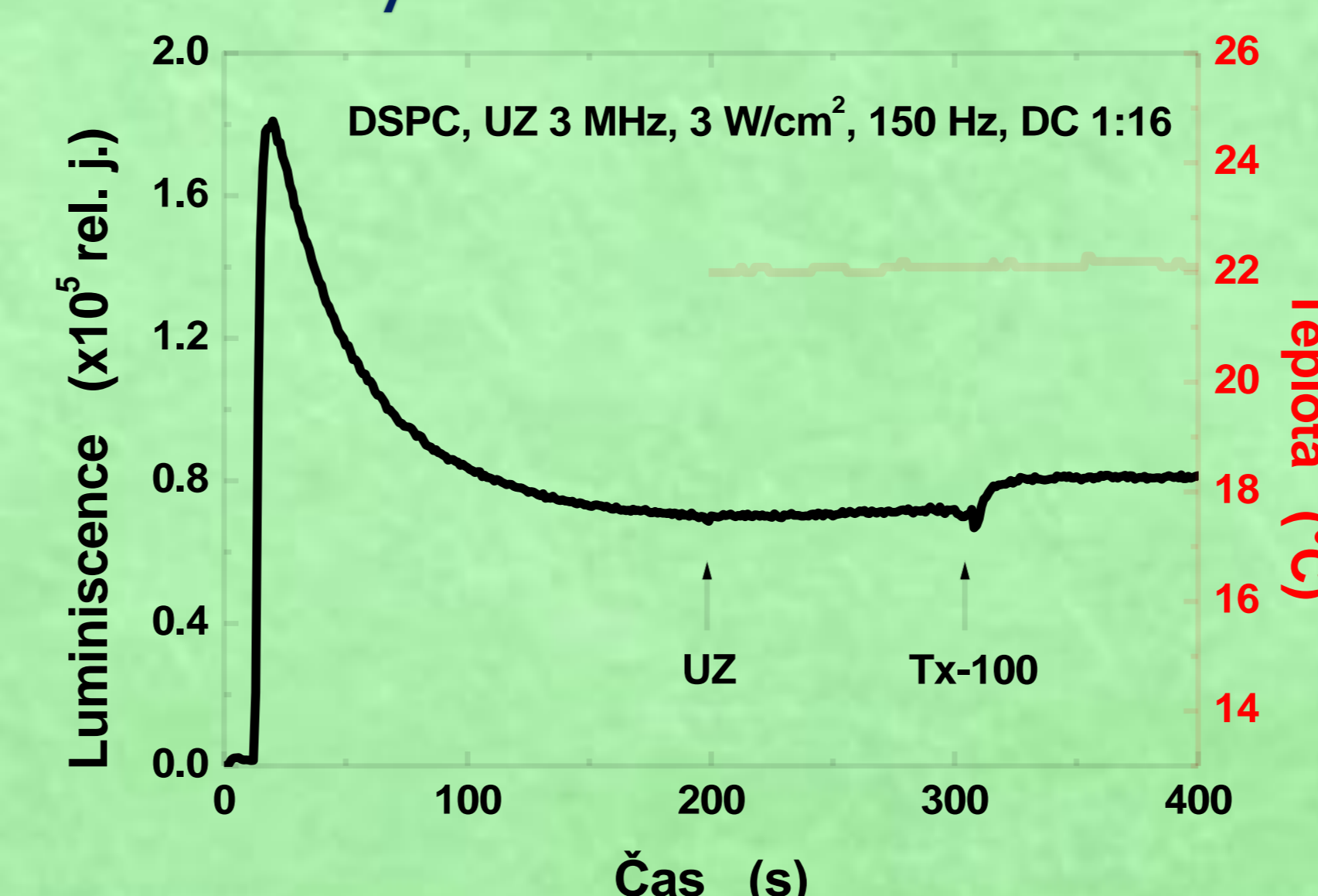
Odstranění extravezikulárního ATP bylo provedeno pomocí dvou 5 ml kolonek, naplněných Sephadexem G-25, které se nechaly stočit při 500 ot/min po dobu 2 minut.

MĚŘENÍ UVOLŇOVÁNÍ ATP Z LIPOZOMŮ POMOCÍ ULTRAZVUKU

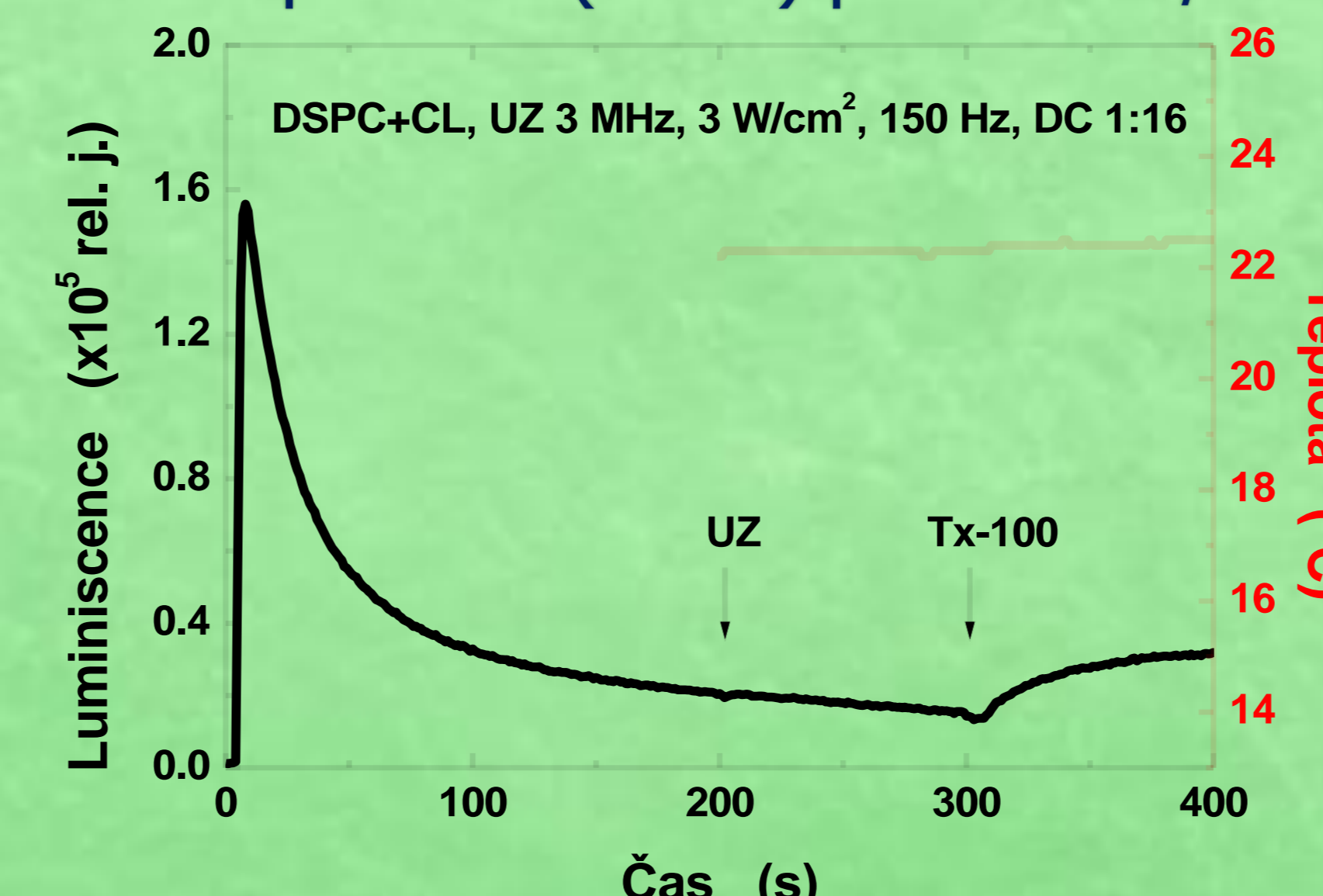
Do kyvety bylo postupně napipetováno 2250 μl 10 mM HEPES, 300 μl lipozomů, 25 μl 50 mM D-luciferinu a 25 μl 5mM MgCl₂. Kyveta byla umístěna do komůrky vyplněné vodou. Po zahájení kinetického měření bylo do kyvety přidáno 10 μl luciferázy o koncentraci 40 μg/ml. Intenzita luminiscence byla měřena pomocí detektoru spektrofluorimetru FLS 980. Při 200 s byl aplikován ultrazvuk (BTL 5000 Smart) o intenzitě 3 W/cm², frekvenci 1 MHz, v pulzech o frekvenci 150 Hz a střídě 1:16, 1:4 nebo 1:2. Při 300 s bylo přidáno 50 μl 1% Triton X-100.

Výsledky

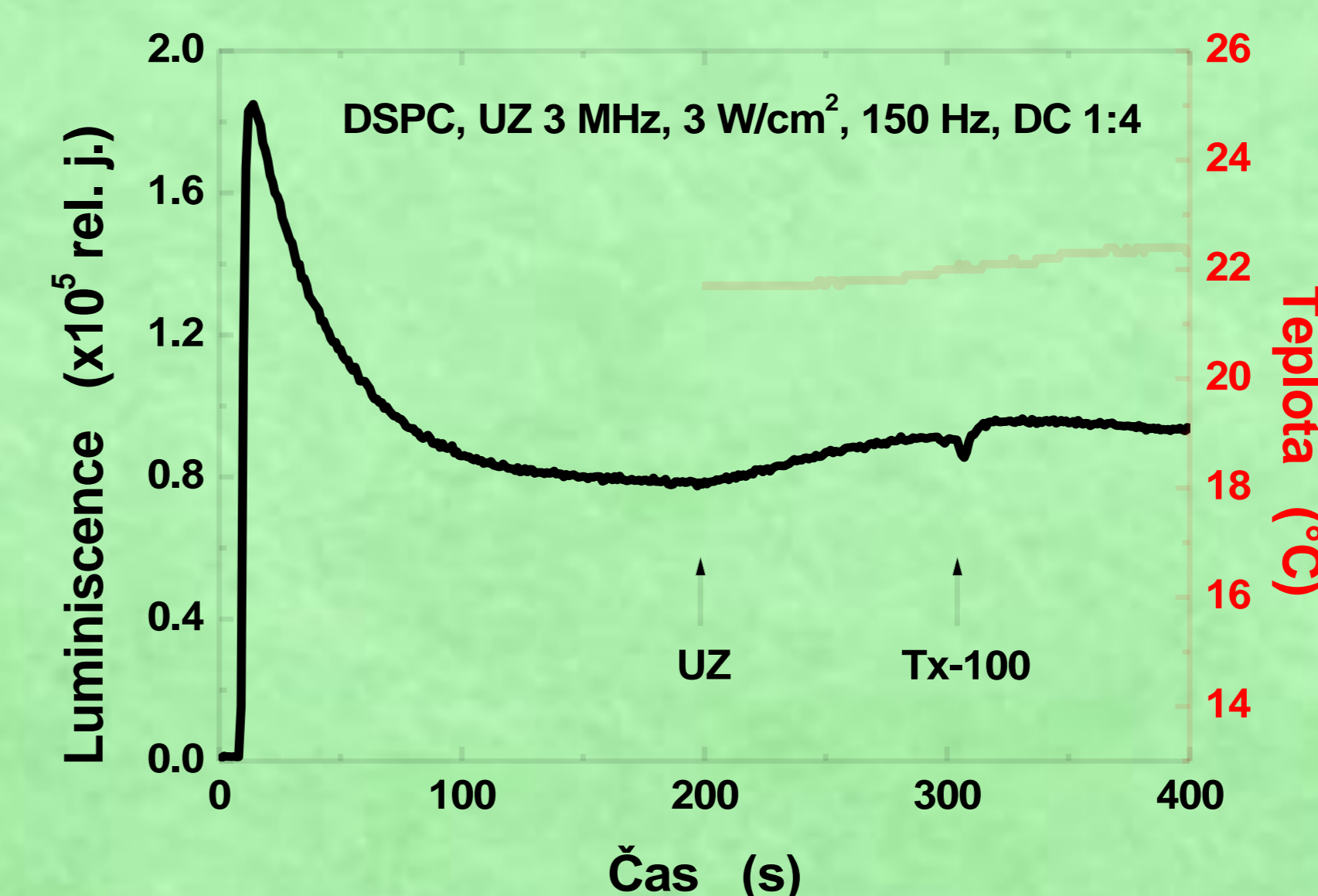
Při aplikaci UZ dochází k významnému nárůstu intenzity luminiscence pouze u jednosložkových lipozomů vytvořených z DSPC. Rychlost nárůstu intenzity se zvyšuje s frekvencí aplikovaných pulzů (se změnou střídě 1:16, 1:4 a 1:2). Změna ve složení lipozomů přidáním mitochondriálního fosfolipidu kardiolipinu (14:0) k DSPC (v molekulárním poměru 3:7) vedla ke zvýšení luminiscence pouze při nejvyšší střídě aplikovaných ultrazvukových pulzů, tj. 1:2. Porovnáme-li intenzity luminiscence a jejich dohasínání v první fázi měření, po přidání luciferázy, pak velikost signálu je nižší u dvousložkových lipozomů. Také rychlost enzymové reakce v této iniciální fázi je rychlejší u lipozomů DSPC s příměsí kardiolipinu. Nižší velikost signálu, rychlejší průběh enzymové reakce a menší odezva vůči UZ může odrážet větší rigiditu lipozomální membrány.



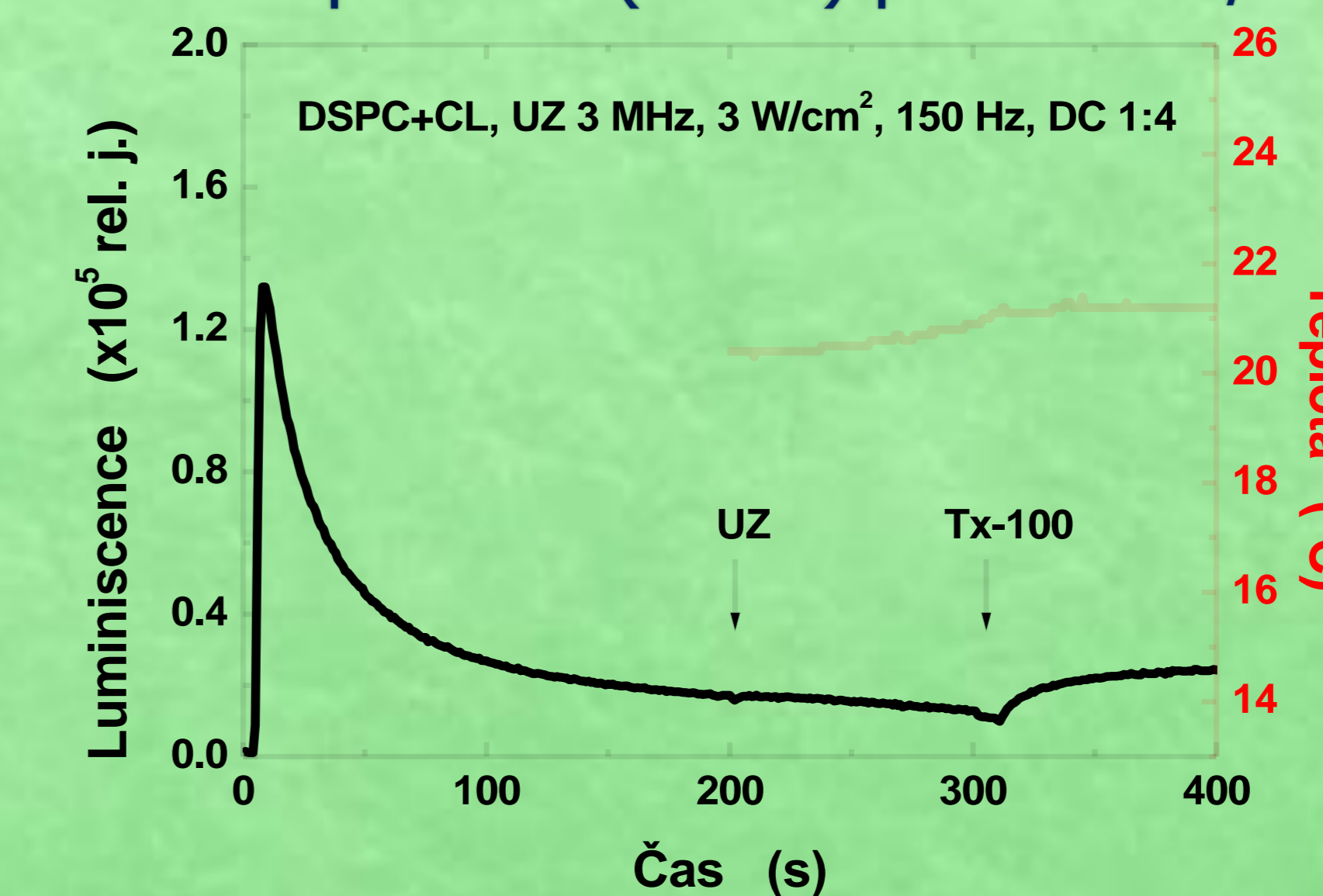
Obr. č. 3: graf ukazující uvolňování ATP z lipozomů (DSPC) při střídě 1/16



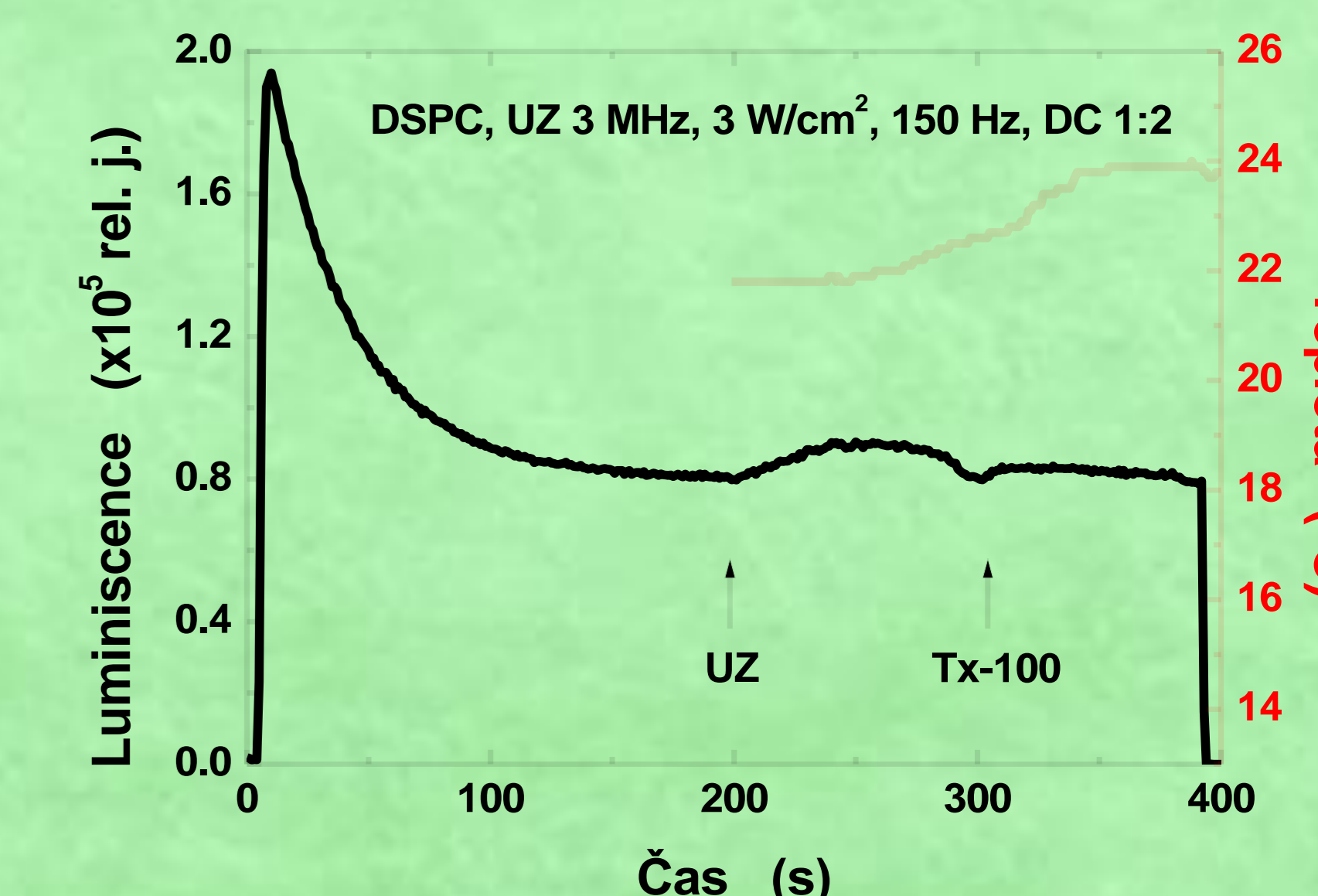
Obr. č. 6: graf ukazující uvolňování ATP z lipozomů (DSPC – CL) při střídě 1/16



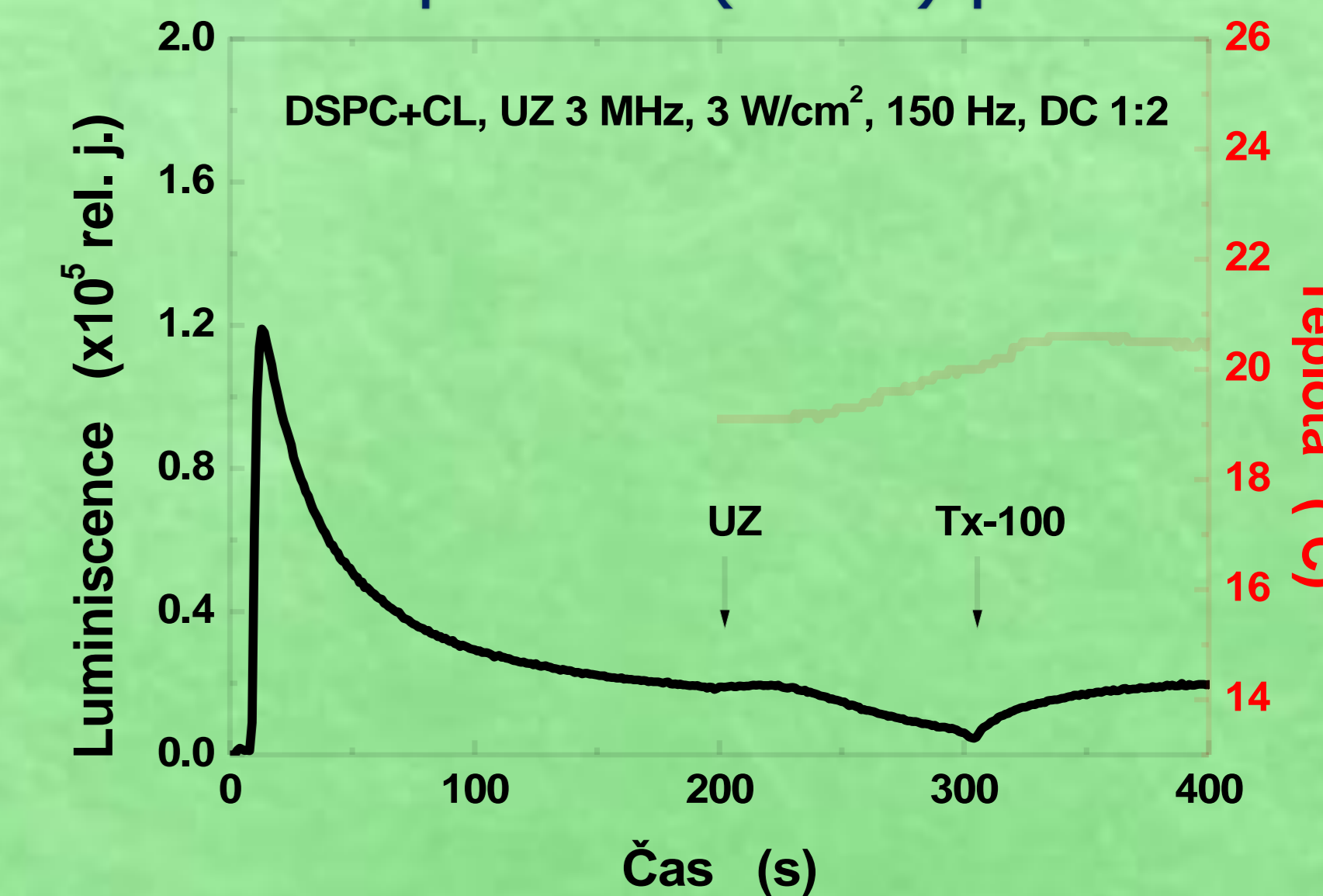
Obr. č. 4: graf ukazující uvolňování ATP z lipozomů (DSPC) při střídě 1/4



Obr. č. 7: graf ukazující uvolňování ATP z lipozomů (DSPC – CL) při střídě 1/4



Obr. č. 5: graf ukazující uvolňování ATP z lipozomů (DSPC) při střídě 1/2



Obr. č. 8: graf zobrazující uvolňování ATP z lipozomů (DSPC – CL) při střídě 1/2

Závěr

Pomocí luminiscenční metody využívající reakci luciferin-luciferáza se ověřily možnosti jejího použití při měření uvolňování nízkomolekulárních látek z lipozomů pomocí vysokofrekvenčního ultrazvuku. K uvolnění látek z lipozomů je nutné použití vyšších intenzit, což může vést k rychlému nárůstu teploty. Z toho důvodu se zvolilo pulzní aplikování vysokofrekvenčního ultrazvukové energie. Výsledky potvrdily, že citlivost lipozomů vůči vysokofrekvenčnímu ultrazvuku závisí na složení lipozomů. Lipozomy obohacené o kardiolipin vykazují větší stabilitu než v případě lipozomů tvořených pouze DSPC.

Reference

- [1] Bangham AD. Nature, 192, 1197–1198, 1961; [2] Bangham AD. Chem Phys Lipids, 64, 275–285, 1993; [3] Elkhoury K, Koçak P, Kang A et al. Pharmaceutics, 12, 849, 2020 [4] Elkhoury K, Sanchez-Gonzalez L, Lavrador P et al. Polymers, 12, 2944, 2020; [5] Arab-Tehrany E, Elkhoury K et al. Int J Mol Sci, 21, 7276, 2020; [6] Singh SK, Singh S, Willard J et al. Int J Nanomed, 12, 6205–6218, 2017; [7] Webster DM, Sundaram P, Byrne ME. Eur J Pharm Biopharm, 84, 1–20, 2013; [8] Ahmed SE Martins AM, Hussein GA. J Drug Target, 23, 16–42, 2015 [9] <https://avantilipids.com/product/850365>, <https://avantilipids.com/product/710337>

Tato studie byla podpořena grantovým projektem NU21J-03-00062