

Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Pavčina Peikertová

Studium stability liposomů

Fyzikální ústav Univerzity Karlovy

Vedoucí bakalářské práce: *RNDr. Eva Kočiřová, Ph.D.*

Studijní program: *Fyzika, Obecná fyzika*

2007

Poděkování:

Ráda bych touto cestou chtěla poděkovat *RNDr. Evě Kočišové, Ph.D.* za zadání zajímavého tématu a za všestrannou a obětavou pomoc a za věnovaný čas.

Dále děkuji Ing. Petru Prausovi, CSc. za konzultace při měření, Doc. RNDr. Jiřímu Bokovi, CSc. za doladění programu ELSA 2006 a Mgr. Radku Macháňovi za zapůjčení diplomové práce.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat i všem ostatním pracovníkům Fyzikálního ústavu Univerzity Karlovy za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci napsala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce.

V Praze dne 29.5.2007

Pavλίna Peikertová

Obsah:

Abstrakt	4
1. Předmluva	5
2. Lipidové membrány	6
2.1 Biologické membrány a transport látek.....	6
2.2 Liposomy.....	9
3. Metoda měření a aparatura	12
3.1 Elastický rozptyl světla	12
3.2 Popis aparatury.....	14
3.3 Obsluha aparatury.....	16
4. Měření a výsledky	17
4.1 Příprava vzorků liposomů	17
4.2 Měření vzorků	19
4.3 Vyhodnocení naměřených závislostí	20
5. Závěr	27
Použitá literatura	28

Název práce: *Studium stability liposomů*
Autor: *Pavčina Peikertová*
Katedra (ústav): *Fyzikální ústav Univerzity Karlovy*
Vedoucí práce: *RNDr. Eva Kočíšová, Ph.D.*
e-mail vedoucího: kocisova@karlov.mff.cuni.cz

Abstrakt:

Liposomy jsou syntetické váčky jejichž stěna je tvořena dvojitou vrstvou lipidů oddělující vnitřní prostředí od vnějšího s odlišným složením. Používají se k různým účelům, mimo jiné i jako modelový systém při studiu transportu molekul. Při přípravě liposomů je možné nastavit lipidové složení tak, aby se co nejvíce přibližovalo membránám živých buněk. Z hlediska použitelnosti liposomů je potřebné znát jejich stabilitu v čase, tedy jak dlouho od přípravy si suspenze liposomů zachovává své původní vlastnosti. Bakalářská práce je zaměřena na testování stability suspenze liposomů v čase pomocí techniky elastického rozptylu. Byla proměřena úhlová závislost intenzity rozptýleného záření pro tři připravené systémy. Na základě naměřených dat bylo ověřeno, že po dobu přibližně jednoho týdne sledované systémy nepodléhaly změnám.

Klíčová slova: *lipid, membrána, liposomy, transport molekul, elastický rozptyl světla*

Title: *Study of liposome stability*
Author: *Pavčina Peikertová*
Department: *Institute of Physics of Charles Univerzity*
Supervisor: *RNDr. Eva Kočíšová, Ph.D.*
Supervisor's e-mail address: kocisova@karlov.mff.cuni.cz

Abstract:

Liposomes are the synthetic vesicles with walls formed by the lipid bilayer separating inner media from the outer with different composition. They are applied for different purposes, i.e. as model systems to study molecular transport. Lipid composition can be chosen during their preparation, so that the membrane structure can mimic the structure of the living cell membrane. In the light of liposome application, it is inevitable to study their stability in time; it means how long the suspension conserves their primary properties. The aim of bachelor thesis is to test the stability of liposome suspension in time by using the technique of elastic scattering of light. Angle dependence of the intensity of scatter light was measured for three prepared systems. On the base of the obtained data, it was verified that the studied systems haven't changed during one week.

Keywords: *lipid, membrane, liposomes, molecular transport, elastic scattering of light*

1. Předmluva

Tato práce se zabývá studiem stability liposomů v čase pomocí techniky elastického rozptylu světla na přestavěné aparatuře Photo-gonio-diffusometre model 42.000 (A.R.L. – FICA, France), původně z roku 1967.

První část práce je teoretická. Druhá kapitola se zabývá strukturou a vlastnostmi biologických membrán a transportem látek přes ně, k čemuž jako modelový systém slouží liposomy. Třetí kapitola shrnuje základní poznatky o teorii elastického rozptylu světla a také popisuje měřicí aparaturu a program na její obsluhu, jež jsem k měření použila.

Druhá část mé bakalářské práce, tedy čtvrtá kapitola je věnovaná postupu přípravy vzorků a samotnému měření vzorků suspenzí liposomů. Jsou zde uvedeny výsledky měření a jejich interpretace. V závěrečné páté kapitole shrnuji výsledky mé práce.

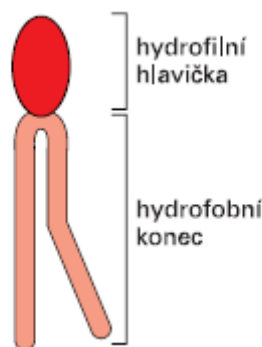
2. Lipidové membrány

2.1 BIOLOGICKÉ MEMBRÁNY A TRANSPORT LÁTEK

Buňka, základní jednotka živého systému, je obklopena obalem, který ji zároveň i odděluje od okolního prostředí. Tento obal se nazývá *plasmatickou membránou*. Její stavba je jednoduchá, jedná se o dvě těsně přiléhající vrstvy lipidových molekul, o celkové tloušťce 5-8 nm. Eukaryotní buňky obsahují uvnitř i další membrány, které ohraničují jednotlivé vnitrobuněčné organely, přičemž jejich tloušťka a složení je dáno charakterem funkce, kterou vykonávají.

Lipidy jsou složeny ze dvou základních odlišných částí *hydrofilní hlavičky* a dvou *uhlovodíkových řetězců*, které tvoří *hydrofobní část* molekuly, viz Obr. 2.1. V případě fosfolipidů Obr. 2.2 A (např. fosfatidylcholin, fosfatidylserin), je hydrofilní hlavička napojena na hydrofobní část přes fosfátovou skupinu. Molekuly s hydrofilní i hydrofobní částí nazýváme *amfipatické*.

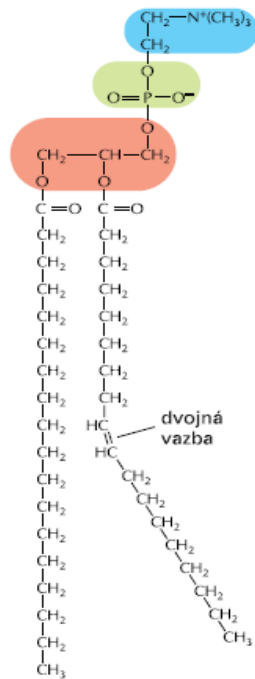
Důležitou složkou membrán je kromě fosfolipidů u živočišných buněk i cholesterol, což je sterol, který lidský organismus potřebuje pro tvorbu steroidních hormonů a vitamínu D. Chemický vzorec je zobrazen na Obr 2.2 B. Přítomnost cholesterolu v membránách živočišných buněk snižuje jejich tekutost a činí tedy membrány méně propustnými [1].



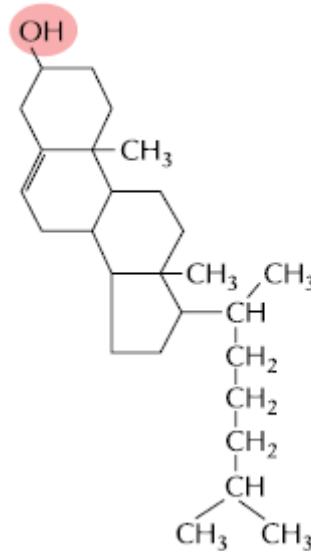
Obr. 2.1: Molekula lipidu [1].

Membrány obsahují i další látky jako např. *proteiny* a také *glykolipidy*, které obsahují cukerný zbytek v místě hydrofilní hlavičky [1, 10 a 13].

A

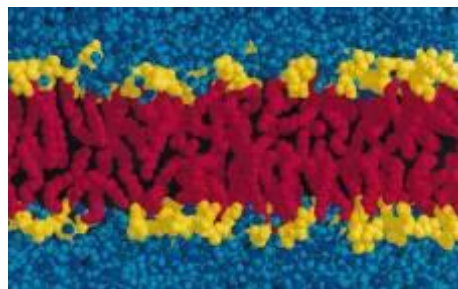


B



Obr. 2.2: A- Molekula fosfatidylcholinu. B- Molekula cholesterolu [1].

Hydrofilie je vlastnost molekul umožňující energeticky výhodnou interakci s vodou. Oproti tomu hydrofobní molekuly jsou ve vodě zcela nerozpustné, neboť atomy jsou nenabitě a nepolární a tudíž nejsou schopny vytvářet vodíkové můstky s molekulami vody. Amfipatická molekula tyto dvě protikladné vlastnosti spojuje. Hydrofilní hlavička je přitahována k vodě, zatímco hydrofobní konec se vodě vyhýbá. Pro amfipatické molekuly jsou výhodná uspořádání do dvojvrstev, což je vidět na Obr. 2.3. Toto uspořádání uspokojuje obě zúčastněné části. Hlavičky jsou natočeny směrem k vodnímu prostředí, zatímco uhlovodíkové konce leží jeden vedle druhého ve vnitřním prostoru [1 a 10].



Obr. 2.3: Lipidová dvojvrstva (žlutá část - hydrofilní hlavičky, červená část - hydrofobní uhlovodíkové konce, modrá část - vodné prostředí) [1].

Lipidy díky vodnému prostředí uvnitř buňky i mimo ni nemohou dvojvrstvu opustit, ale mohou se pohybovat v samotné membráně a tudíž si mohou vyměňovat navzájem svá místa. K tomuto jevu dochází poměrně často a nazývá se *laterální difúze*. Můžeme také říci, že se membrána chová jako dvojrozměrná tekutina.

Méně častým jevem v lipidové dvojné vrstvě je tzv. *flip-flop pohyb*, nebo-li vertikální překlápění. Jedná se o pohyb molekul lipidů z jedné monovrstvy do druhé, pokud hydrofilní hlavička překlene hydrofobní část membrány. Bez speciálních proteinů k němu dochází jen velmi zřídka.

Membrána zajišťuje transport látek důležitých pro vývoj a růst buňky do buňky a vyplavuje odpadní látky ven z buňky pomocí vysoce selektivních kanálů, které prostupují celou membránou. Tyto kanály tvoří molekuly proteinů, které umožňují import a export specifických látek v závislosti na druhu proteinu.

Vnitřní hydrofobní část vytváří bariéru pro většinu hydrofilních molekul. Většina molekul je schopna přes membránu difundovat, ale rychlost difúze závisí na rozpustnosti a velikosti molekuly. Nejrychleji přes membránu difundují malé nepolární molekuly (kyslík, oxid uhličitý), protože propustnost plynů je velmi důležitá pro buněčné dýchání. Nenabitě polární molekuly, tedy molekuly s nerovnoměrným rozložením náboje, také poměrně rychle difundují pokud jsou dostatečně malé (voda, ethanol), ale například glycerol či glukosa difundují velmi pomalu až téměř vůbec. Pro všechny ionty a nabitě molekuly bez ohledu na jejich velikost je membrána téměř zcela nepropustná [2].

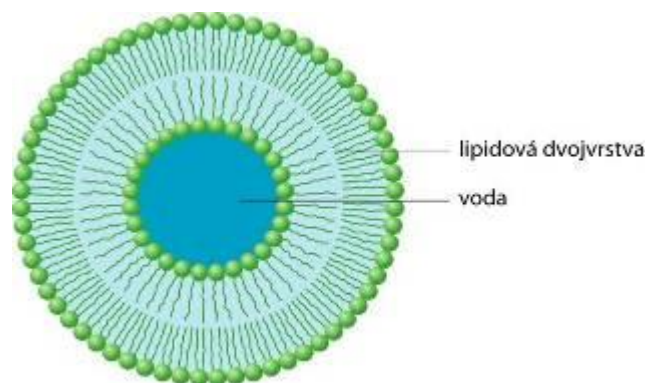
Pro život buňky je důležitý i transport mnoha jiných molekul. Pokud by měly přes membránu pouze difundovat, byl by přenos příliš pomalý. Proto se používají zvláštní transportní proteiny, přenos pomocí nich je tzv. *aktivní transport*. Proteiny mají v membránách kromě funkce transportní také funkci katalytickou, enzymatickou, či fungují jako receptory.

Úplnou strukturu známe jen u několika málo membránových proteinů. Jednou z metod, která je velmi užitečná při určování struktury proteinů je *rentgenová krystalografie*.

Membrány mají rovněž mechanické vlastnosti, které se uplatňují při růstu buňky, či změně jejího tvaru. Toto vše probíhá bez ztráty celistvosti, či jejího poškození [1].

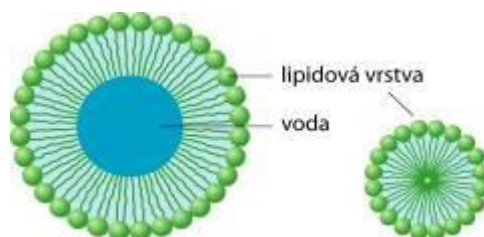
2.2 LIPOSOMY

Liposomy, nebo-li lipidové vesikuly, jsou syntetické váčky jejichž stěna je tvořena dvojitou vrstvou lipidů oddělující vnitřní prostředí od vnějšího s odlišným složením, jak znázorňuje Obr. 2.3. Můžou vytvářet mono či multilamelární struktury [13 a 17].



Obr 2.3: Liposom [9].

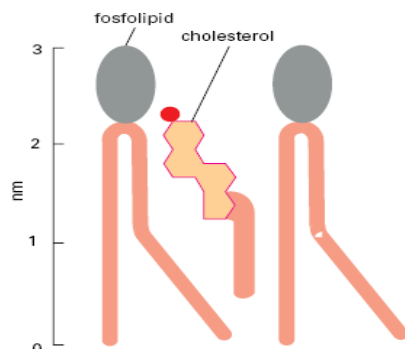
Liposomy se spontánně tvoří, když jsou lipidy rozptýleny ve vodné fázi. Vznikají tak vesikuly, nebo také micely o velikosti několik desítek nanometrů až mikronů. Micela je tvořena pouze jednou lipidovou vrstvou a její uspořádání do kulovitého tvaru je energeticky výhodné, Obr. 2.4.



Obr. 2.4: Micela [9].

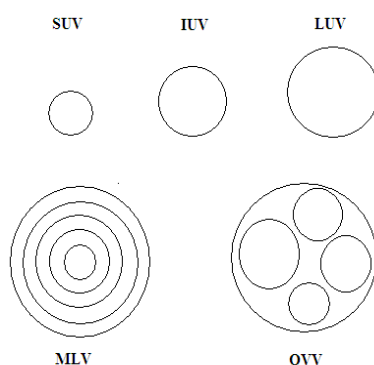
Membrána liposomu může být tvořena z různých typu lipidů, jejím složením tak můžeme napodobit membránu buňky. Do liposomální membrány je možné zabudovat i cholesterol, viz Obr. 2.5. Jelikož se jedná o amfipatickou molekulu, svou OH skupinou má tendenci se přibližovat k polární hlavičce molekuly fosfolipidu a svou přítomností výrazně ovlivňovat tekutost membrány.

Charakteristiky liposomů se liší podle metody, jakou byly připraveny. Způsobem přípravy lze ovlivnit počet lamel, velikost liposomu a množství enkapsulované látky [17].



Obr. 2.5: Zobrazení navázání cholesterolu mezi fosfolipidy v membráně. Polární hydroxylová skupina cholesterolu je natočena k hydrofilní části lipidů [1].

Liposomy můžeme dělit podle velikosti a počtu lamel na *malé unilamelární* (SUVs – small unilamellar vesicles) s velikostí 15 - 25 nm, *střední unilamelární* (IUVs – intermediate-sizes unilamellar vesicles) jež mají *stovky nm* a *velké unilamelární* (LUVs – large unilamellar vesicles) tyto už mají průměr nad 1000 nm. *Multilamelární liposomy* (MUVs – multilamellar vesicles) mají obvykle velikost kolem 100- 1000 nm. *Oligovesikulární liposomy* (OVVs - oligovesicular vesicles) obsahují ve své vnitřní části menší liposomy [13 a 17]. Jak jednotlivé struktury vypadají ukazuje Obr 2.6.



Obr. 2.6: Znázornění dělení liposomů podle velikosti a počtu lamel.

Pokud liposom vzniká ve vodném prostředí, obsahujícím rozpustné složky (soli, bílkoviny atd.), jsou tyto složky uzavřeny do vnitřního prostředí vaku. Tohoto

se pak využívá v lékařství pro *transport* některých *léčiv* do buněk (intravenosní aplikace vhodných liposomů, které pak vnikají do buněk endocytosou, což je jeden z mechanismů přenosu molekul nebo částic z vnějšího prostředí do buňky) [1 a 17].

Liposomy mohou sloužit jako zjednodušený modelový systém pro různé účely, mimo jiné i při sledování transportu molekul přes membránovou strukturu. Při studiu tohoto typu je nutné znát stabilitu liposomů v čase, tedy jak dlouho od přípravy si suspenze liposomů zachovává své původní vlastnosti. Pro fyzikální charakterizaci těchto struktur, tedy určení velikosti a tvaru, je možné použít techniku elastického rozptylu světla.

3. Metoda měření a aparatura

3.1 ELASTICKÝ ROZPTYL SVĚTLA

Při šíření elektromagnetického záření hmotným prostředím dochází k nuceným oscilacím nábojové hustoty v molekulách, jež vyvolává oscilující elektrické pole. Tyto oscilace jsou synchronní s budícím polem. Elementárním dipólem můžeme tyto oscilace nábojové hustoty aproximovat a stávají se zdrojem sekundárního záření o stejné frekvenci. V ideálním krystalu, který zajišťuje dokonale homogenní prostředí, je mezi zářením emitovaným blízkými molekulami definovaný fázový rozdíl, a tudíž dochází k interferenci. Tato interference je, jak uvádí [8 a 15], v případě rovinné vlny destruktivní ve všech směrech krom směru šíření budícího záření.

Světlo může s prostředím reagovat také neelasticky, což znamená, že dochází k přenosu energie mezi prostředím a zářením. Ovšem komplikovanější situace nastává v prostředí jež obsahuje nehomogenity jejichž rozměry jsou nezanedbatelné vůči vlnové délce elektromagnetického záření. Za nehomogenity považujeme např. makromolekuly rozpuštěné v rozpouštědle, kovové koloidy, či buňky suspendované ve vodě nebo také liposomy. Přítomností nehomogenit je narušena destruktivní interference sekundárních vln, jež se poté vzorkem šíří odlišně než předpovídá zákon odrazu a lomu. Takto dochází k *rozptylu světla*, který nazýváme *elastický* [15]. Při tomto rozptylu nedochází ke změně vnitřní energie molekul vzorku. Nehomogenity způsobující elastický rozptyl světla nazýváme *rozptylová centra*. Teorie rozptylu zkoumá polarizační vlastnosti a úhlové rozložení intenzity rozptýleného záření, jež závisí na velikosti a tvaru rozptylových center.

Míra použitelných aproximací a tedy složitost výsledných výrazů závisí na poměru velikosti rozptylového centra a vlnové délky dopadajícího záření, k tomuto posouzení se používá bezrozměrná veličina α definovaná:

$$\alpha = \frac{2\pi r}{\lambda}, \quad (3.1)$$

kde r je poloměr rozptylového centra a λ je vlnová délka dopadajícího záření.

Pro λ můžeme napsat

$$\lambda = \frac{\lambda_0}{m_0}, \quad (3.2)$$

kde m_0 je index lomu okolního prostředí.

V závislosti na velikosti parametru α existují tři základní teorie popisu elastického rozptylu : *Rayleighova teorie*, *Rayleighova-Debeyova teorie* a *Mieova teorie*

Nejjednodušší popis elastického rozptylu je *Rayleighova teorie*, která považuje rozptylová centra za elementární dipóly. Toto přiblížení je použitelné pouze pro velmi malá rozptylová centra. Z obecnějšího popisu lze stanovit hranici použitelnosti této teorie. Obvykle je stanovena parametrem $\alpha \leq 0,3$ [8].

Rayleighova-Debeyova teorie se zabývá popisem rozptylových center libovolného tvaru, jež je rozděleno na elementy o objemu v , které už jsou dostatečně malé pro Rayleighovu teorii. Každá fáze dílčí vlny jež je emitovaná libovolným objemovým elementem je závislá jen na poloze elementu vůči bodu pozorování, nezávisí však na vzdálenosti, po kterou se vlna šíří v rozptylovém centru. Tedy každý element považujeme za excitovaný původní dopadající vlnou,[8].

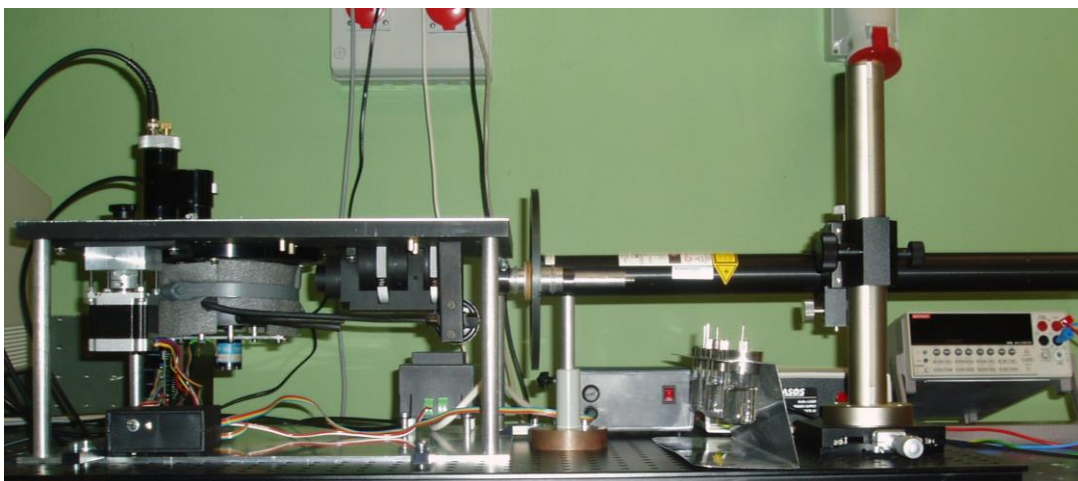
Pro sféricky symetrická rozptylová centra o libovolné velikosti se používá *Mieova teorie*. Pro malá rozptylová centra vede tato teorie k Rayleighově teorii a pro velká rozptylová centra vede k výsledkům teorie lomu, odrazu, či difrakce záření na rozptylovém centru. Tato teorie je pro libovolně velká centra velmi složitá a obsahuje nekonečné řady a speciální funkce [6 a 7]. Mieovu teorii můžeme aplikovat i na nehomogenní rozptylová centra, ale musí být zachován sféricky symetrický tvar rozptylového centra. Nejjednodušší případ je koule složená ze dvou vrstev, což v našem případě vede na aplikaci na liposomy.

V buněčných suspenzích bývá rozptyl světla obvykle popisován pomocí Mieovy teorie. Ale občas je používána Rayleighova-Debyeova teorie pro popis rozptylu úhlů na bakteriích [3 a 16].

3.2 POPIS APARATURY

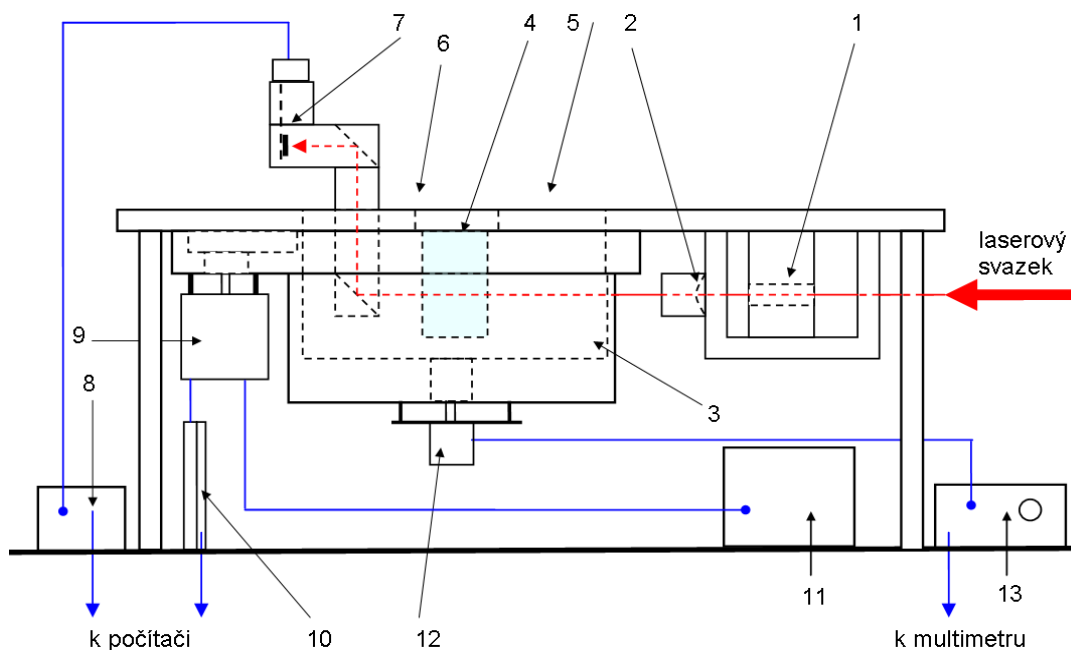
Aparatura pro měření elastického rozptylu, kterou jsem při měření používala, byla přestavěna z přístroje Photo-gonio-difusometre model 42.000 (A.R.L. – FICA, France) z roku 1967. Její kompletace a testování bylo součástí diplomové práce Radka Macháně [11]. Současný stav difusometru je vyfocen na Obr. 3.1 a jeho schéma je znázorněno na Obr. 3.2. Při popisu aparatury čerpám z uvedené diplomové práce a svým popisem se omezují jen na to nejdůležitější.

Kompletní aparatura je umístěna na optické desce o rozměru $900 \times 600 \text{ mm}$. Jako zdroj záření je používán Helium-Neonový laser o vlnové délce $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ a výkonu 50 mW . Laserový svazek prochází přes kruhový neutrální filtr s proměnlivou optickou hustotou, čímž můžeme regulovat intenzitu procházejícího svazku.



Obr. 3.1: Fotografie měřicí aparatury [11].

Svazek je fokusován planárně-konvexní čočkou do středu válcové kyvety se vzorkem. Tato je umístěna ve středu otočného stolku s goniometrickou stupnicí, na které lze odečítat úhel natočení stolku. Natáčení stolku je umožněno krokovým motorkem a je řízeno speciální deskou připojenou k počítači. Kyveta se vzorkem je ponořena do kovové válcové nádoby, povrch které je černě anodizován, aby nedocházelo k reflexím na stěnách. Nádoba je naplněna imersní kapalinou - *dodekanem*, jehož index lomu je poměrně blízký indexu lomu skla, tudíž pomáhá eliminovat nežádoucí jevy na stěnách kyvety, a také zajišťuje minimální odpar díky jeho vysokému bodu varu. Každá kyveta je opatřena kovovým víčkem, které zabraňuje pronikání světla z okolního prostředí do vzorku.



Obr. 3.2: Schéma difuziometru. Na obrázku je pohled z boku. Legenda: 1 – otočný držák s polarizátory; 2 – fokusující čočka; 3 – nádoba s imersní kapalinou; 4 – kyveta se vzorkem; 5 – otočný stolek; 6 – průzor pro pozorování vzorku; 7 – držák detektoru; 8 – zesilovač; 9 – krokový motor; 10 – řídicí deska krokového motoru; 11 – stejnosměrný napěťový zdroj pro krokový motor; 12 – stejnosměrný motor magnetické míchačky; 13 – řídicí jednotka magnetické míchačky (upraveno z [11]).

Plášť nádoby s imersní kapalinou je opatřen dvěma skleněnými okénky, která směřují do dvou navzájem kolmých směrů. Jedním z nich laserový svazek vstupuje do nádoby a druhé slouží k pozorování stopy laserového svazku. Součástí přístroje je i externí termostat, který reguluje teplotu lázně, tedy i teplotu vzorku v kyvetě. Na otočném stolku je také umístěn držák detektoru světla (křemíková fotodioda), do kterého vstupuje záření rozptýlené pod různými úhly v závislosti na natočení stolku.

Signál z detektoru je veden přes zesilovač a následně do počítače, kde je digitalizován a vzorkován ve zvolených časových intervalech. Minimální vzorkovací interval je $10 \mu s$.

Aby se předešlo sedimentaci vzorku je aparatura vybavena magnetickou míchačkou. Rychlost míchání musí být nastavena dostatečně velká, aby se zabránilo sedimentaci vzorku, ale zároveň nesmí ve vzorku vyvolávat vír.

3.3 OBSLUHA APARATURY

Obsluha aparatury je téměř plně automatizována a slouží k ní program ELSA speciálně navržený Doc. RNDr. Jiřím Bokem, CSc.. Používala jsem verzi programu ELSA 6 [5], jež byla nepatrně upravena z verze ELSA 5 [4]. Program řídí pohyb otočného stolku, tedy nastavuje rozptylový úhel, sbírá data a vypočítává základní charakteristiky: průměr měřeného signálu, směrodatnou odchylku, statistický histogram, spektrální hustotu a autokorelační funkci, a zapisuje je do výstupních souborů.

Do programu ELSA je nutné zadat vstupní údaje a to vzorkovací interval, počet měřených hodnot, posloupnost úhlů, které chceme proměřit, počet cyklů měření a kmenové jméno.

Vzorkovací interval se zadává do políčka „*Interval [ms]*“. Nejmenší možná hodnota, kterou lze zadat, je rovna maximální rychlosti vzorkovací karty, která načítá data, a to je $10 \mu s$.

Počet vzorků musí být roven celočíselné mocnině dvou, kvůli dalšímu zpracování naměřených dat. Proto se v kolonce „*Počet hodnot*“ vybírá z celočíselných mocnin od 64 do 16 384.

Součin těchto dvou kolonek je zobrazen v políčku „*Doba měření*“.

Pomocí textového souboru zadáváme posloupnost úhlů, pro něž chceme proměřit intenzity rozptýleného záření. Tento textový soubor musí být uložen v adresáři „*ELRdata*“ a počáteční písmeno názvu souboru musí být „*U*“. Soubor musí obsahovat posloupnost nezáporných celých čísel, které odpovídají velikostem úhlů ve stupních.

Název, který se zapíše do kolonky „*Kmenové jméno*“, bude tvořit vždy začátek všech souborů do kterých se budou ukládat naměřená data. Jedná se o *.txt* soubory obsahující časovou závislost intenzity, spektrální hustotu, hodnoty autokorelační funkce, data statistického histogramu a soubor s průměry intenzit v jednotlivých cyklech.

Celý program se spouští tlačítkem „*Start*“ a po spuštění již nelze zadané údaje měnit.

4. Měření a výsledky

4.1 PŘÍPRAVA VZORKŮ LIPOSOMŮ

Pro studium stability liposomů jsem připravila celkem tři vzorky: dva byly tvořeny čistě *fosfolipidy* a jeden obsahoval příměs *cholesterolu*.

Na přípravu liposomů jsem použila Asolectin (Fluka) ze sojových bobů. Jedná se o směs fosfolipidů, která obsahuje minimálně 25% fosfatidylcholinu. V závislosti na typu liposomů existuje několik druhů přípravy liposomů. Já jsem při přípravě sledovala postup uvedený v [14].

Nejdříve jsem si připravila dva vzorky liposomů za pomoci polykarbonátové membrány s póry o průměrech 100 a 1000 nm bez příměsi cholesterolu. Naměřila jsem na digitálních vahách asolectin ve formě prášku. Ten jsem rozředila v chloroformu. Asolectin se v chloroformu velmi dobře rozpouští a stačilo nádobkou jen několikrát zatřepat. Chloroform bylo nutné z nádobky nechat odpařit, k tomuto účelu jsem použila stlačený dusík, jímž jsem nádobku s roztokem pomalu vyfoukala. Bylo nutné s nádobkou při vyfoukávání neustále otáčet, aby se na stěnách vytvářel film a nedocházelo k tvoření shluků. Po celkovém odpaření chloroformu se na stěnách baňky vytvořil tenký lipidový film.

Do nádobky jsem dále přidala *pufr*, (ústojný roztok, který je schopný udržovat v jistém rozmezí stabilní *pH* po přidání silné kyseliny či zásady do systému). Použila jsem pufr *TRIS* (se sumárním chemickým vzorcem $C_4H_{11}NO_3$) o koncentraci *50 mM* a *pH 7,3*. Takto vzniklý roztok měl koncentraci *7,5 mg/ml*.

Bylo nutné vše důkladně promíchat, aby nedošlo ke tvorbě shluků. K tomuto účelu jsem použila třepačku Vortex. Ale i přes důkladné míchání bylo potřebné nádobku ještě ponořit do ultrazvukové lázně, která odbourala vzniklé shluky.

Liposomy jsem nakonec připravila protlačováním přes polykarbonátovou membránu pomocí zařízení Liposofast-Basic (Avestin, Inc.) Obr. 4.1. Jedná se o dva teflonové válečky, mezi než se umísťuje zvolená membrána na gumové O-kroužky. Zda je umístění správné se lze přesvědčit pozorovacím otvorem. Válečky se k sobě přišroubují přes šroubový uzávěr a je nutno dávat pozor, aby nedošlo k protržení membrány. Dále jsou součástí Liposofast-Basic dvě Hamilton stříkačky o objemu

500 μl , pomocí nichž se roztok protlačuje přes membránu. Jedna je označena značkou, abychom věděli do které jsme roztok natáhli. Doporučeno je 19 protlačení.

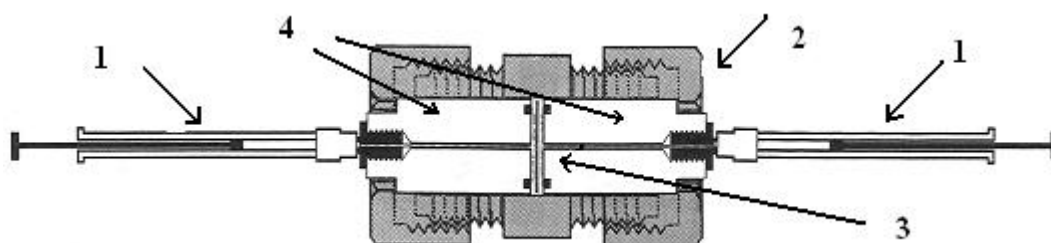
A



B



C



Obr. 4.1: Zařízení Liposofast-Basic (Avestin, Inc.). A – dva bílé teflonové válečky s gumovými O-kroužky, dva šroubové uzávěry a pouzdro s otvorem, B- celkový pohled, C- Schéma (upraveno z [12]) 1- Hamilton stříkačka, 2- šroubový uzávěr, 3- polykarbonátová membrána, 4- teflonový váleček.

Použila jsem membrány s póry o velikosti 100 a 1000 nm. Přetlačený roztok jsem umístila do skleněné kyvety o průměru 20 mm a objemem 10 ml, která měla kovový držák pro umístění do aparatury. Touto přípravou vznikly 2 ml liposomů o 100 a 1000 nm. Ke každému jsem přidala dalších 9 ml pufry. Dostala jsem tak dva vzorky, každý představoval 10-krát zředěnou původní suspenzi.

Vzorek s cholesterolem (Sigma, grade 99+%) jsem připravovala stejným postupem. Pro jeho přípravu jsem navázila asolectin a cholesterol. Připravila jsem vzorek s koncentrací 7,5 mg/ml asolectinu a s 10% příměsí cholesterolu. Při rozpouštění filmu lipidů v pufry stačilo v tomto případě obsah pouze dostatečně promíchat, protože se nevytvořily žádné shluky. K protlačování jsem použila membránu s póry o velikosti 1000 nm. Takto jsem získala 1 ml vzorku suspenze liposomů s cholesterolem, který jsem opět 10-násobně zředila a pak proměřila.

4.2 MĚŘENÍ VZORKŮ

Na připravených vzorcích liposomů jsem měla zkoumat jejich stabilitu v čase, proto jsem každý vzorek měřila hned v den přípravy, následně druhý den, za tři dny, týden a dva týdny od přípravy.

Vzorky jsem skladovala v ledničce při 4°C. Před měřením jsem nechala vzorek zahřát na pokojovou teplotu. Kvyety se vzorkem jsem umístila do aparatury na určené místo v držáku. Šedý filtr byl nastaven na propustnost 3.

Dále bylo třeba posunout uzávěrku detektoru do polohy zapnuto, abychom byli schopni měřit signál. Také bylo nutné zapnout magnetickou míchačku, aby se předešlo sedimentaci vzorku.

V programu ELSA 2007 [5] jsem nastavila parametry měření. Vzorkovací interval jsem nastavila na *100 ms* a počet hodnot na *1024*, z tohoto byla doba měření pro jeden úhel vypočtena na *1 min 42 s*. Pro zadávání úhlů jsem použila textový soubor „*UA.txt*“, který byl uložen v adresáři „ELRdata“ a obsahoval 16 hodnot úhlů (*10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 a 150*). Počet cyklů opakování byl 5.

4.3 VYHODNOCENÍ NAMĚŘENÝCH ZÁVISLOSTÍ

Program ELSA 6 [5] zpracoval všechna měření a pro každý měřený systém vytvořil pět datových souborů. Tyto obsahují navzorkované hodnoty intenzity, spektrální hustoty, autokorelační funkce, data statistického histogramu a průměrné hodnoty a směrodatné odchylky intenzit z celého měření.

Pro svou práci jsem využila soubor s průměrnými intenzitami a s daty statistického histogramu. Všechny data jsem zpracovala v programu *SigmaPlot 8.0*.

Srovnání průměrných intenzit v závislosti na úhlech pro 100 nm liposomy je znázorněno v Grafu č. 4.1, pro 1000 nm liposomy v Grafu č. 4.2 a pro 1000 nm liposomy s cholesterolem v Grafu č. 4.3. Průměrná intenzita byla vypočtena z absolutních intenzit pomocí programu ELSA 6 [5].

Ze všech měření jsem vybrala dva cykly, jež zde uvádím jako ukázkou naměřených dat, a to ve formě histogramů. Vybrala jsem 4. cyklus měření 1000 nm liposomů druhý den po přípravě a 4. cyklus měření 1000 nm liposomů s cholesterolem po dvou týdnech od přípravy, Grafy č. 4.4 - 4.35.

Odborné články uvádí, že liposomy mohou při uchovávání podléhat degradaci, nebo-li změnám, a to jak chemických, tak i fyzikálních vlastností. Stabilita liposomů v čase je silně závislá i na tom, z jakých lipidů jsou liposomy vytvořeny a z jakého zdroje tyto lipidy pochází. Všeobecně je známo, že lipidy z biologických zdrojů, jako např. vejce nebo sojové boby, jsou daleko méně stabilní než lipidy připraveny syntetickou cestou [17]. Uchovávání suspenzí v chladném prostředí může degradaci minimalizovat a je tak s nimi možné pracovat déle. V našem případě se na základě měření ukázalo, že po dobu jednoho týdne systém nevykazuje změny. Z Grafů č. 4.1 - 4.3 je vidět, že průměrné hodnoty intenzit rozptýleného záření při měření v den přípravy, druhý den od přípravy a tři dny od přípravy se téměř shodují. Změny jsou však už patrné týden a dva týdny od přípravy, kdy dochází k růstu průměrné intenzity. Což může být způsobeno tvořením shluků nebo agregátů. U vzorku s cholesterolem při měření po dvou týdnech byly již vidět shluky i pouhým okem.

Při úhlu 10° byla nejmenší naměřená intenzita u vzorku 100 nm liposomů a největší u vzorku s cholesterolem. Při zkoumání průměrných intenzit bylo patrné, že vzorek s cholesterolem byl stabilní i týden po přípravě, protože intenzita se lišila jen

nepatrně. Ale u vzorků bez cholesterolu se změna intenzity projevila už po týdnu. Při srovnání 100 nm a 1000 nm liposomů zjistíme, že stabilnější je vzorek s 1000 nm liposomy. U 100 nm liposomů došlo k prvnímu většímu nárůstu intenzity již 3 dny po přípravě, kdežto u 1000 nm až po týdnu od přípravy.

Dále mě zajímaly statistické histogramy, ukázky jsou znázorněny v Grafech č. 4.4 - 4.35, kde předpokládáme Gaussovské rozložení intenzity. Pro malé úhly bylo toto rozložení splněno u větších úhlů však docházelo k rozdvajování, tedy daly se rozeznat dvě Gaussovy křivky. Tento jev si vysvětluji tím, že ve vzorku byly obsaženy i jiné velikosti liposomů, nebo-li objektů, než velikost pórů použité polykarbonátové membrány. Tuto membránu si mohu představit jako síto, které mi nepropustí větší útvary než je jeho pór, ale menší mohou póry bez problémů prostupovat. Pro ověření, jestli jsou ve vzorku obsaženy i jiné velikosti liposomů, by bylo vhodné zakoupit kalibrační kuličky a na nich měření provést.

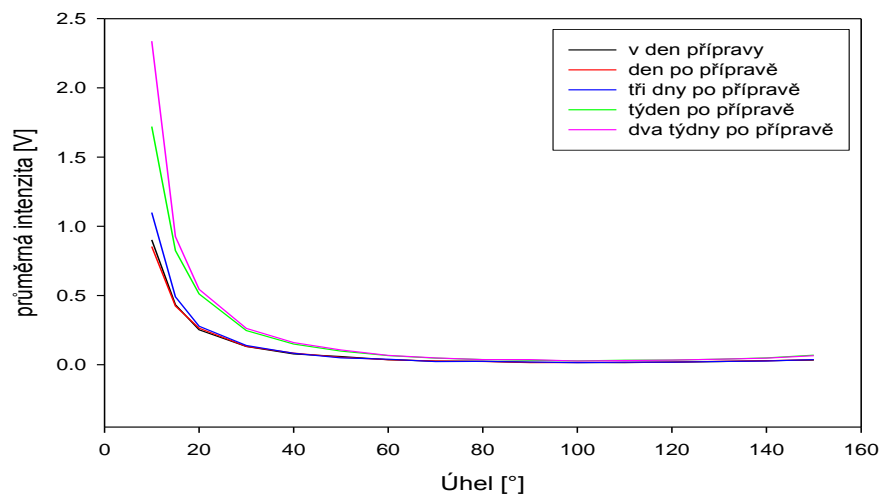
Rozdvajování Gaussových křivek by mohlo být také způsobeno přítomností nečistot z použitého pufru, ale to nepředpokládám. Pro ověření by bylo tedy ještě dobré použít pufr přeměřit.

Porovnávala jsem nástupy rozdvajování u jednotlivých vzorků. V rámci jednoho měření jsou cykly záměnné, tedy nedocházelo k velkým odlišnostem u jednotlivých cyklů jednoho měření.

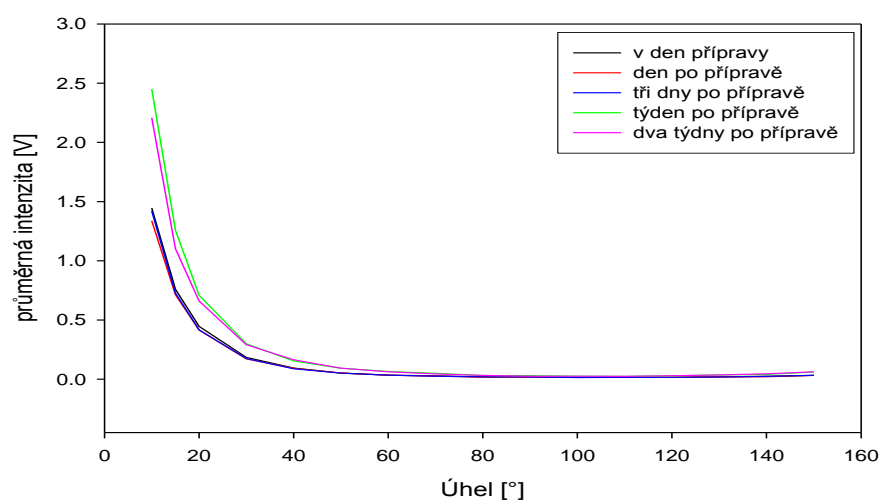
Pro liposomy protlačované přes membránu s průměrem 100 nm při prvních měření docházelo k nástupu u úhlu 50. Ale hodnota nástupního úhlu se s časem změnila. U posledního měření, tedy měření za dva týdny po přípravě byl již nástup u úhlu 70.

Pro vzorek liposomů připravován membránou s velikostí pórů 1000 nm byl nástup patrný již kolem úhlů 30. Opět i tady s časem došlo k posunu a nástup se objevil až u úhlu 50-60. Srovnávala jsem opět první a poslední měření.

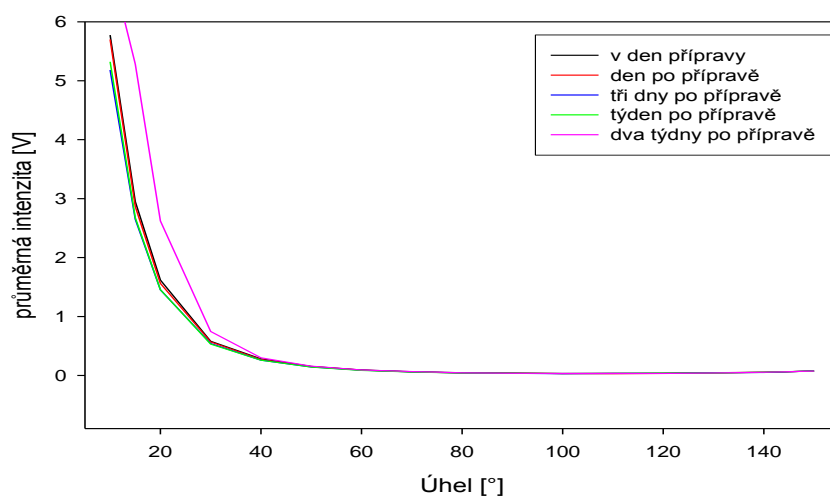
U vzorku, který obsahoval příměs cholesterolu, byl také tento jev pozorován. Nástup zde při prvních měření začínal u úhlů 60-70. U tohoto vzorku ke změnám nástupu nedošlo. Při měření za dva týdny po přípravě byl nástup opět mezi úhly 60-70.



Graf č. 4.1: Srovnání průměrných intenzit v závislosti na úhlu pro 100 nm liposomy.

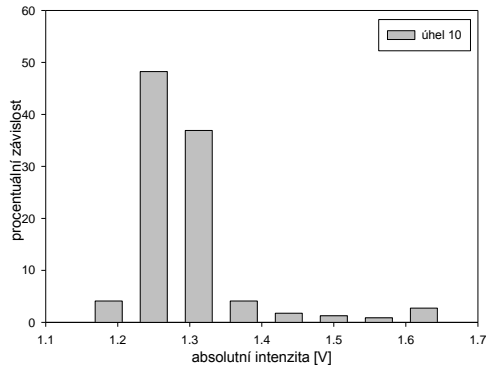


Graf č. 4.2: Srovnání průměrných intenzit v závislosti na úhlu pro 1000 nm liposomy.

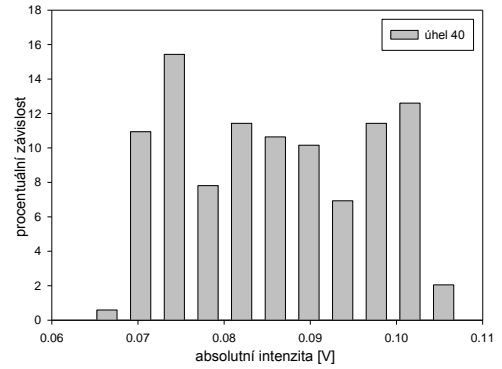


Graf č. 4.3: Srovnání průměrných intenzit v závislosti na úhlu pro 1000 nm liposomy s příměsí cholesterolu.

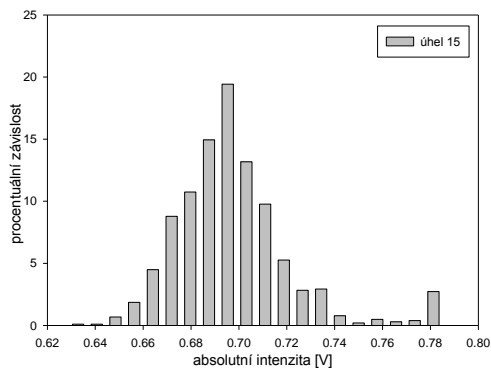
4. cyklus měření 1000 nm liposomů
druhý den po přípravě



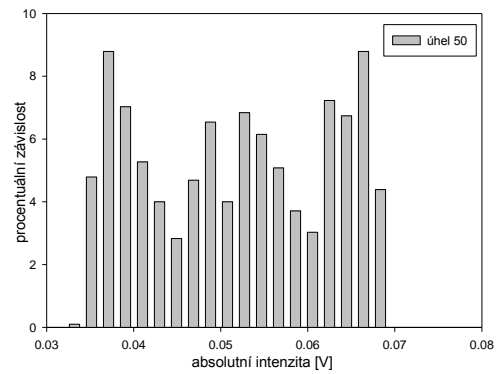
Graf č. 4.4: Statistický histogram úhlu 10



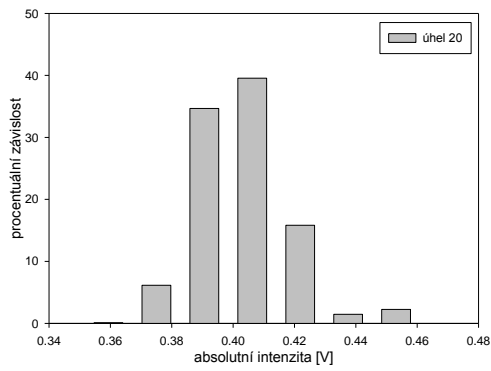
Graf č. 4.8: Statistický histogram úhlu 40



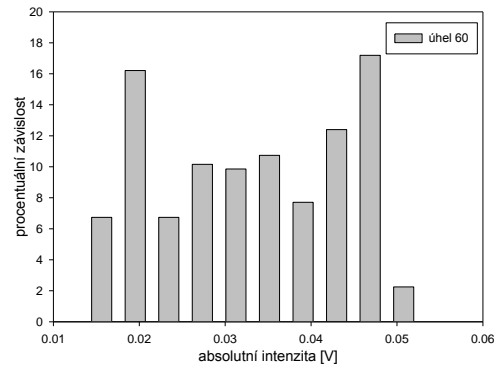
Graf č. 4.5: Statistický histogram úhlu 15



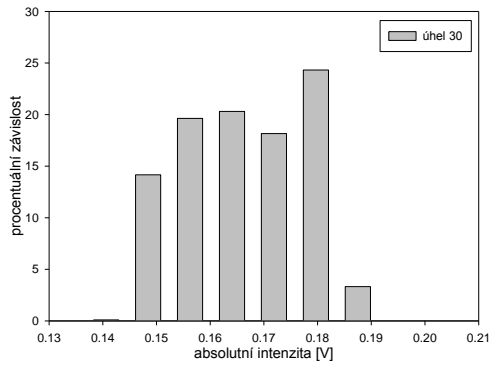
Graf č. 4.9: Statistický histogram úhlu 50



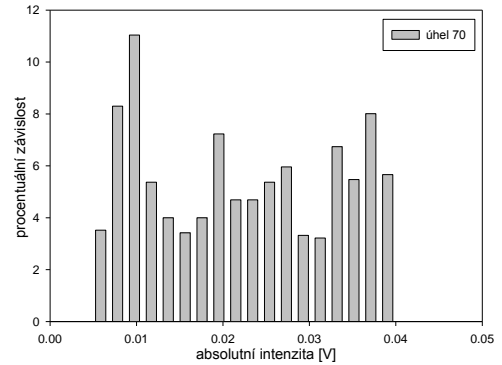
Graf č. 4.6: Statistický histogram úhlu 20



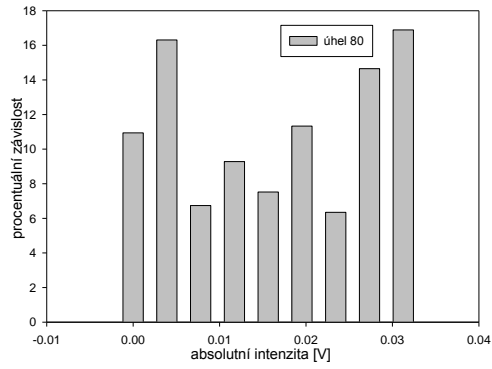
Graf č. 4.10: Statistický histogram úhlu 60



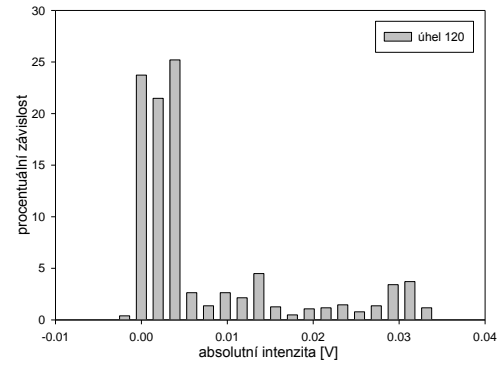
Graf č. 4.7: Statistický histogram úhlu 30



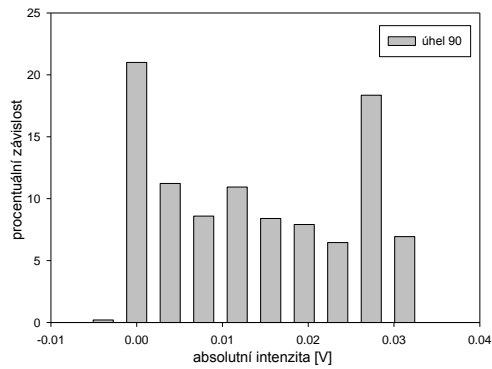
Graf č. 4.11: Statistický histogram úhlu 70



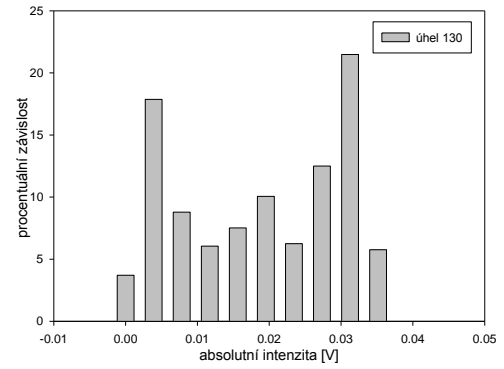
Graf č. 4.12: Statistický histogram úhlu 80



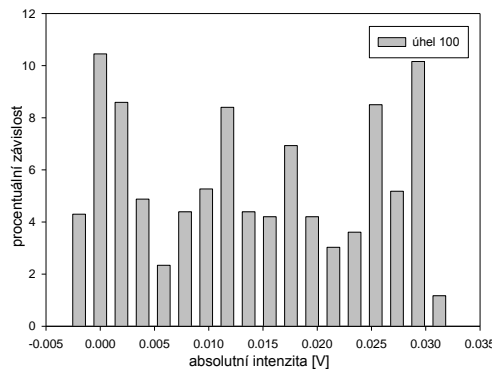
Graf č. 4.16: Statistický histogram úhlu 120



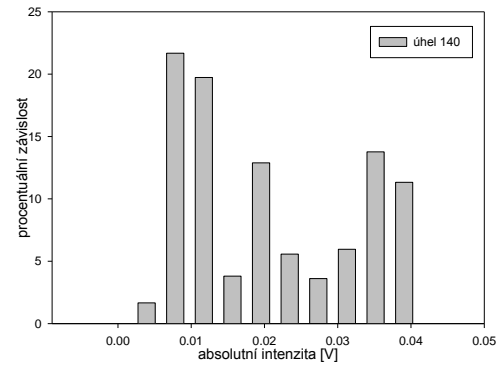
Graf č. 4.13: Statistický histogram úhlu 90



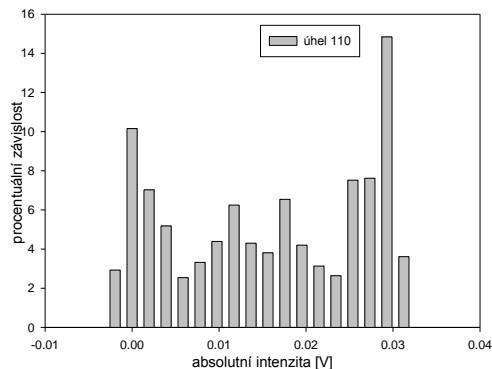
Graf č. 4.17: Statistický histogram úhlu 130



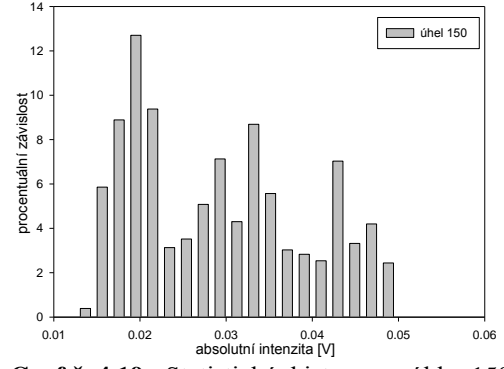
Graf č. 4.14: Statistický histogram úhlu 100



Graf č. 4.18: Statistický histogram úhlu 140

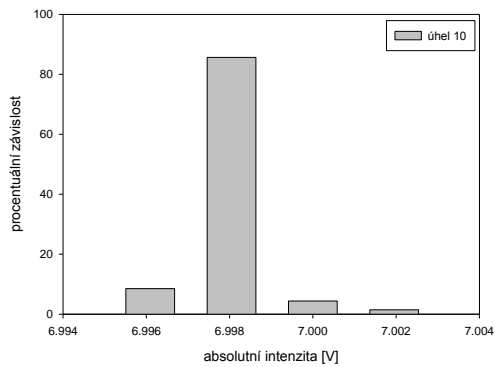


Graf č. 4.15: Statistický histogram úhlu 110

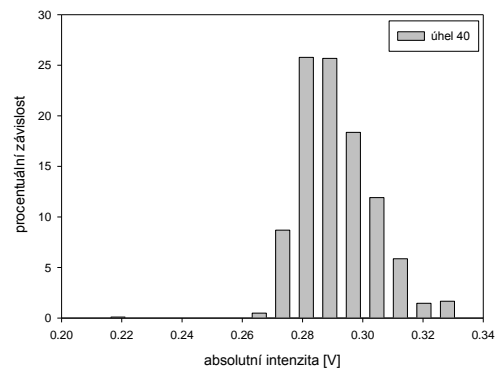


Graf č. 4.19: Statistický histogram úhlu 150

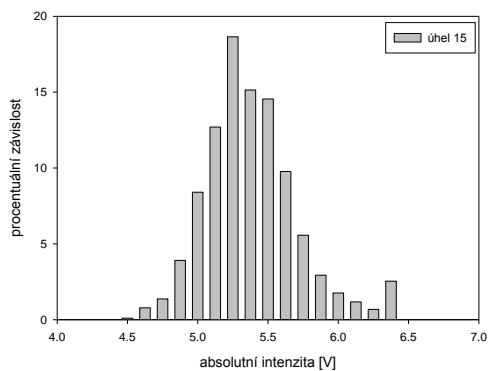
4. cyklus měření 1000 nm liposomů
s cholesterolem po dvou týdnech od
přípravy



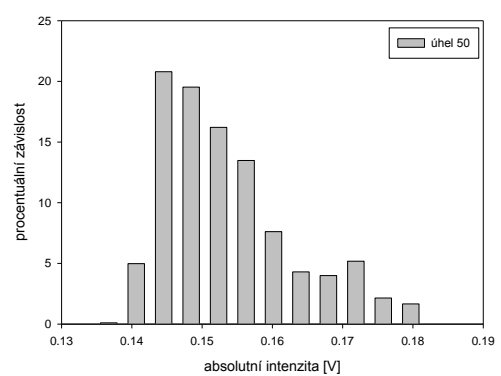
Graf č. 4.20: Statistický histogram úhlu 10



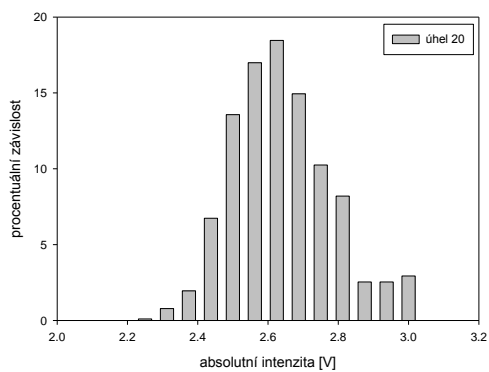
Graf č. 4.24: Statistický histogram úhlu 40



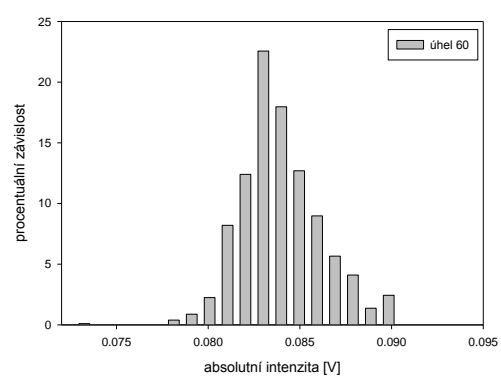
Graf č. 4.21: Statistický histogram úhlu 15



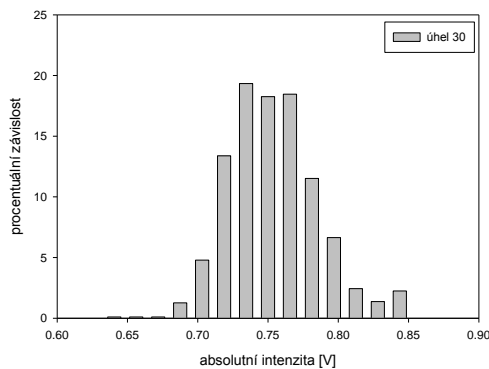
Graf č. 4.25: Statistický histogram úhlu 50



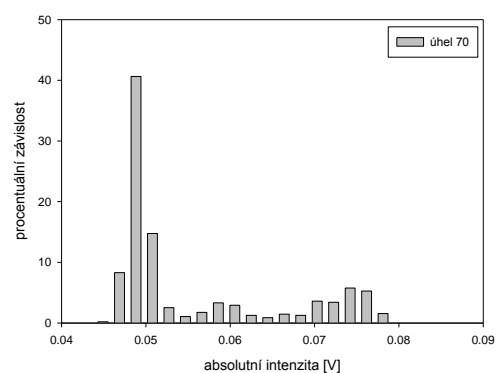
Graf č. 4.22: Statistický histogram úhlu 20



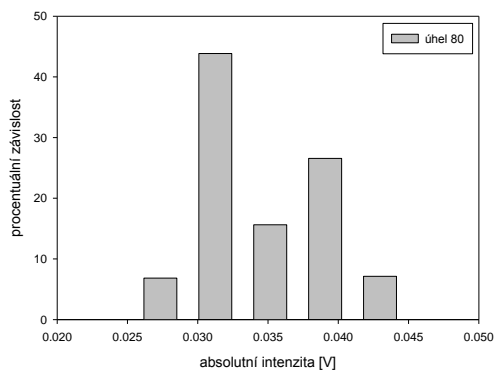
Graf č. 4.26: Statistický histogram úhlu 60



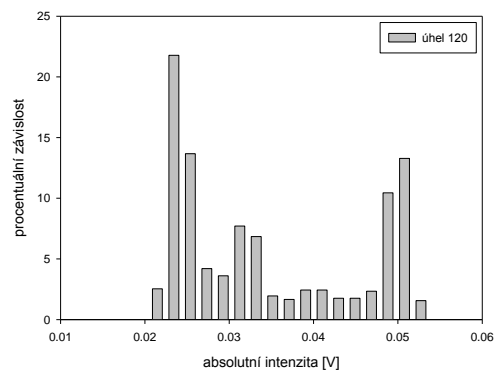
Graf č. 4.23: Statistický histogram úhlu 30



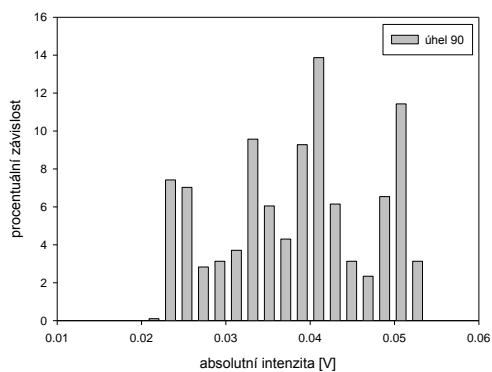
Graf č. 4.27: Statistický histogram úhlu 70



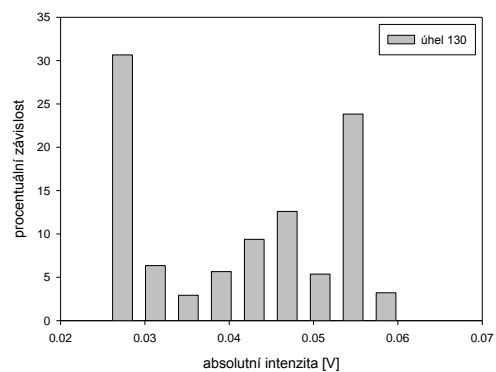
Graf č. 4.28: Statistický histogram úhlu 80



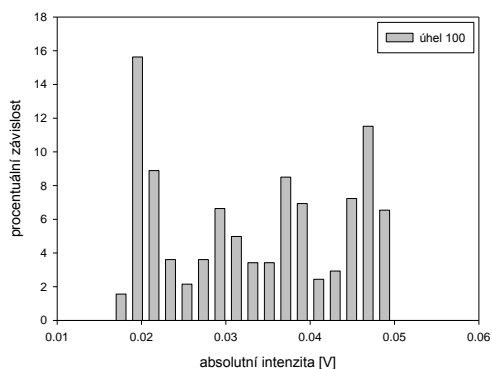
Graf č. 4.32: Statistický histogram úhlu 120



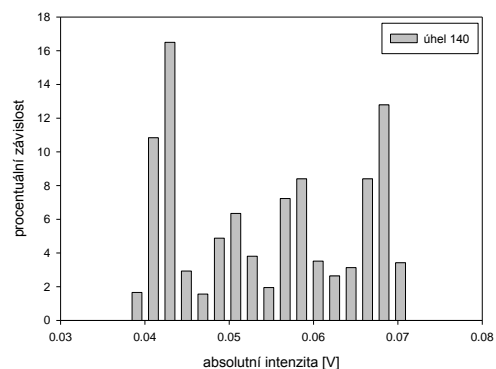
Graf č. 4.29: Statistický histogram úhlu 90



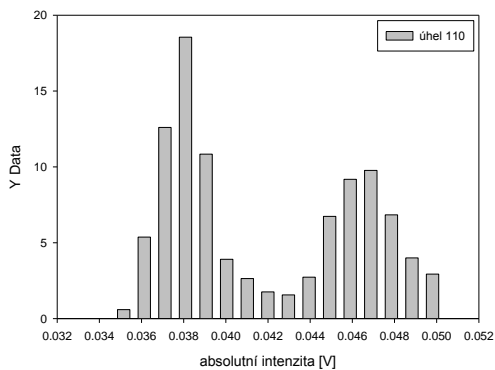
Graf č. 4.33: Statistický histogram úhlu 130



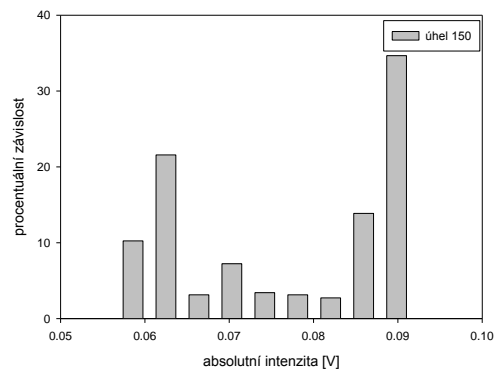
Graf č. 4.30: Statistický histogram úhlu 100



Graf č. 4.34: Statistický histogram úhlu 140



Graf č. 4.31: Statistický histogram úhlu 110



Graf č. 4.35: Statistický histogram úhlu 150

5. Závěr

V průběhu práce jsem se seznámila s postupem přípravy liposomů a připravila tři vzorky suspenze liposomů pomocí polykarbonátových membrán o velikostech pórů 100 a 1000 nm. Membrány liposomů obsahovaly směs fosfolipidů z toho jeden vzorek obsahoval 10% příměs cholesterolu.

Na těchto vzorcích jsem zkoumala jejich stabilitu v čase metodou elastického rozptylu světla. Photo-gonio-diffusometre model 42.000 - aparatura na měření elastického rozptylu - byl ovládán přes počítač pomocí programu ELSA 6. Na něm jsem proměřovala úhlovou závislost intenzity elastického rozptylu a její změny v čase.

Vzorky jsem měřila v den přípravy, den po přípravě, tři dny po přípravě, týden a dva týdny po přípravě. Z naměřených průměrných hodnot intenzit jsem zjistila, že vzorky při skladování v chladném prostředí při 4°C můžeme za stabilní považovat přibližně týden.

Dále jsem na statistických histogramech pozorovala rozdvajování Gaussovské křivky. Tuto skutečnost si vysvětluji tím, že v měřené suspenzi byly přítomny i částice jiné velikosti než-li ty, které odpovídaly rozměrům pórů polykarbonátové membrány použité při přípravě liposomů.

Použitá literatura:

- [1] Alberts et al. (2001): *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing, Ústí nad Labem.
- [2] Berg J.M., Tymoczko J.L. and Stryer L. (2002): *Biochemistry*. Fifth Edition, W. H. Freeman, New York, Chapter 12.4.
- [3] Berkman R. M., Wyatt P.J. (1970): *Differential light scattering measurements of heat-treated bacteria*. Applied Microbiology, **20**, 510-512.
- [4] Bok J. (2006): *Program ELSA 5*. FÚ UK, Praha.
- [5] Bok J. (2007): *Program ELSA 6*. FÚ UK, Praha.
- [6] Boll R.H. (1958): *Tables of light scattering functions*. The University of Michigan Press, Ann Arbor.
- [7] Du H. (2004): *Mie-theory calculations*. Applied Optics, **43**, 1951-1956.
- [8] Kerker M. (1969): *The scattering of light and other electromagnetic radiation*. Academic Press, New York.
- [9] Kodíček M. (2004): *Biochemické pojmy*. VŠCHT, Praha.
- [10] London E. (2004): *Lipid Bilayer Structure*. Encyklopedia of Biological Chemistry, **2**, 576-579.
- [11] Macháň R. (2006): *Diplomová práce – Komplexní charakterizace buněčných suspenzí pomocí elastického rozptylu světla*.
- [12] MacDonald R.C., MacDonald R.I., Menco B.Ph.M., Takeshita K., Subbarao N.K. and Hu L. (1991): *Biochimica et Biophysica Acta*, **1061**, 297-303.
- [13] New R.R.C. (1990): *Liposomes: A Practical Approach*. The Practical Approach Series, Oxford University Press, USA, 1-31.
- [14] Olson F., Hunt C.A., Szoka F.C., Vail W.J. and Papahadjopoulos D. (1979): *Biochimica et Biophysica Acta*, **557**, 9-23.
- [15] Proser V. a kol. (1989): *Experimentální metody biofyziky*. Academia, Praha.
- [16] Robertson B.R. a kol. (1998): *Determination of the concentrations of small bacteria at low concentrations in a mixture of species with forward light scatter measurements with flow cytometry*. Applied and Environmental Microbiology, **64**, 3900-3909.
- [17] Torchilin V., Weissing V. (2003): *A Practical Approach*. The Practical Approach Series, **264**, Oxford University Press.