

ANALIZA WŁAŚCIWOŚCI TERMOTROPOWYCH LIPOSOMÓW METODĄ RÓŻNICOWEJ KALORYMETRII SKANINGOWEJ (DSC) – SYMULACJA KOMPUTEROWA

Wstęp teoretyczny

Liposomy są sferycznymi pęcherzykami zbudowanymi z jednej lub kilku koncentrycznie ułożonych dwuwarstw fosfolipidowych. Otoczka liposomów zbudowana jest analogicznie do błony biologicznej, dlatego też liposomy stanowią dobry model błony komórkowej. Dzięki **amfifilowemu** charakterowi fosfolipidów liposomy mogą jednocześnie enkapsulować (upakować) substancje hydrofilowe we wnętrzu wodnego rdzenia oraz związki hydrofobowe w obrębie dwuwarstwy lipidowej. Ta właściwość sprawia, że od wielu lat stanowią jedną z najważniejszych grup nanonośników stosowanych do **kontrolowanego dostarczania substancji leczniczych**. Współczesna medycyna, a szczególnie onkologia, coraz częściej wykorzystuje liposomy jako systemy transportujące leki do miejsca działania. Zamknięcie substancji czynnej w liposomie pozwala ograniczyć jej toksyczność ogólnoustrojową, wydłużyć czas krążenia we krwi oraz poprawić biodostępność. Odpowiednio zaprojektowane liposomy mogą również zwiększać akumulację leku w tkance nowotworowej, dzięki efektowi zwiększonej przepuszczalności i retencji (*Enhanced Permeability and Retention*, EPR), wynikającemu z charakterystycznej budowy naczyń krwionośnych guzów nowotworowych. Coraz większe znaczenie mają również liposomy o kontrolowanym uwalnianiu leku, których błona zmienia swoje właściwości pod wpływem określonych czynników, takich jak temperatura, pH czy obecność wybranych enzymów.

Właściwości fizykochemiczne liposomów zależą przede wszystkim od składu lipidowego ich błony. Jedną z najważniejszych metod badania właściwości termotropowych dwuwarstw lipidowych jest różnicowa **kalorymetria skanująca** (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC). Metoda ta umożliwia rejestrację ilości ciepła pochłanianego lub wydzielanego przez badaną próbkę podczas kontrolowanego ogrzewania lub chłodzenia. DSC pozwala analizować przejście dwuwarstwy lipidowej liposomów z uporządkowanej fazy żelowej do bardziej płynnej fazy ciekłokrystalicznej. Przejście to obserwowane jest na termogramie jako charakterystyczny pik endotermiczny.

Na podstawie przebiegu termogramu można wyznaczyć kilka parametrów opisujących właściwości błony lipidowej: **temperaturę przejścia fazowego (T_m)**, **zmianę entalpii przemiany fazowej (ΔH)** oraz **szerokość połówkową piku ($\Delta T_{1/2}$)**.

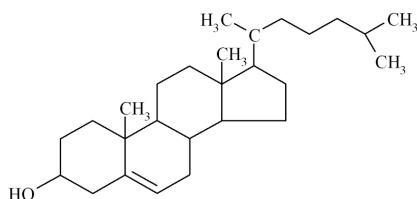
W niniejszym ćwiczeniu wykorzystano komputerową symulację pomiarów DSC. Na podstawie wygenerowanych termogramów studenci wyznaczają wartości parametrów T_m , ΔH oraz $\Delta T_{1/2}$, a następnie analizują wpływ zawartości cholesterolu i DOPC na właściwości termotropowe oraz stabilność modelowej błony lipidowej. Ostatnim etapem jest ocena, który z badanych składów liposomów może stanowić najbardziej korzystny nośnik leków stosowanych w terapii przeciwnowotworowej.

Aparatura

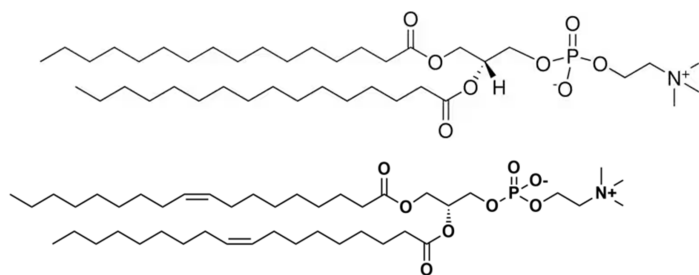
Oprogramowanie komputerowe służące do symulacji pomiarów mikrokalorymetrycznych.

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest poznanie wpływu składu lipidowego błony liposomów na ich właściwości termotropowe oraz ocenę przydatności różnych formułacji liposomowych jako nośników leków przeciwnowotworowych.



cholesterol



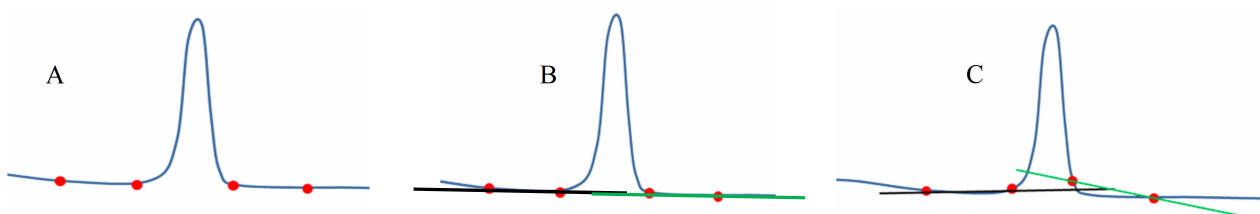
DPPC (1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholina)

DOPC (1,2-dioleilo-sn-glicero-3-fosfocholina)

Przebieg ćwiczenia

I. Badanie wpływu cholesterolu na własności termotropowe błony lipidowej

1. Uruchom program poprzez dwukrotne kliknięcie folderu KALORYMETR.
2. Kliknij przycisk „start”, a następnie wybierz plik L1. Odpowiada on dwuwarstwie lipidowej zbudowanej tylko z DPPC.
3. Zadeklaruj temperaturę początkową 285, temperaturę końcową 350 oraz prędkość skanowania 99999. Następnie wybierz „potwierdź”.
4. Zaznacz, poprzez pojedyncze kliknięcie w odpowiednim miejscu, punkt początkowy oraz punkt końcowy linii bazowej (linia prosta) przed pikiem głównej przemiany fazowej oraz po nim (rysunek A).
5. Po kliknięciu „analiza” przez odpowiednie punkty zostaną poprowadzone proste, które mają za zadanie wskazać programowi właściwy pik mikrokalorymetryczny (odciąć go, rysunek B). Jeśli punkty zostaną zaznaczone w sposób nieodpowiedni (rysunek C) – proste przetną się nie wyodrębniając właściwej części wykresu. Wówczas należy poprawić położenie punktów poprzez ponowne kliknięcie w odpowiednich miejscach termogramu oraz zaznaczenie opcji „analiza”.



6. Odczytaj wartości temperatury przejścia fazowego (T_m), entalpii przemiany fazowej (ΔH) oraz szerokości połówkowej piku ($\Delta T_{1/2}$) i zapisz je w tabeli 1.
7. Kliknij przycisk COFNIJ, aby powrócić do początkowych ustawień.
8. Odczytaj wartości ΔH , T_m oraz $\Delta T_{1/2}$ dla liposomów oznaczonych od L2 do L6, postępując zgodnie z procedurą zawartą w punktach od 2 do 7. Skład liposomów przedstawiono w tabeli 1.
9. Na podstawie uzyskanych wyników, sporządź wykresy zależności T_m , ΔH i $\Delta T_{1/2}$ od zawartości cholesterolu dla liposomów DPPC, DPPC:cholesterol (80:20) i DPPC:cholesterol(60:40).
10. Odpowiedz na postawione pytania.

II. Stabilność liposomów

1. Wygeneruj termogramy wraz z danymi odpowiadające liposomom o tym samym składzie, co w części I, ale po 2 tygodniach użytkowania (pliki podpisane L7-L12), stosując polecenia od punktu 2 do 7 z części I doświadczenia.
2. Wyniki wpisz do tabeli 2 i porównaj z danymi z tabeli 1.
3. Odpowiedz na pytania.

Wymagane wiadomości teoretyczne

1. Budowa i właściwości błon biologicznych – organizacja dwuwarstwy lipidowej, rola fosfolipidów i cholesterolu.
2. Liposomy jako lipidowe nośniki leków.
3. Przemiany fazowe lipidów oraz ich znaczenie biologiczne . Czynniki wpływające na właściwości termotropowe błon lipidowych.
4. Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC) – zasada działania mikrokalorymetru różnicowego, zastosowanie metody DSC w badaniach lipidów i liposomów oraz interpretacja termogramów.
5. Parametry charakteryzujące termogram DSC – temperatura przejścia fazowego (T_m), zmiana entalpii przemiany fazowej (ΔH), szerokość połówkowa pików ($\Delta T_{1/2}$) oraz ich znaczenie w ocenie właściwości i stabilności liposomów.

Literatura

1. J.M.Berg, J.L. Tymoczko, G.J. Gatto, L. Stryer. Biochemia, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa. (Rozdziały dotyczące błon biologicznych i lipidów).
2. A. Kozubek, A.F. Sikorski, J. Szopa . Molekularna organizacja komórki. Cz. 2, Lipidy, liposomy i błony biologiczne. Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego (Wrocław 1996)
3. A. Jankowski, B.Sarecka-Hujar, J.Wysocka. Liposomy - postać modyfikująca transport substancji aktywnych przez skórę. Część 1. Zastosowanie w transporcie leków o działaniu miejscowym. Ann. Acad. Med. Siles. 2011;65
4. K. Taylor, R.Morris. Thermal analysis of phase transition behaviour in liposomes. Thermochim.Acta 1995; 248,289-301
5. Zintegrowana Platforma Edukacyjna – Budowa, funkcje i rodzaje błon biologicznych.
6. Zintegrowana Platforma Edukacyjna – Lipidy – budowa, właściwości i znaczenie biologiczne.
7. <https://apinstruments.pl/skaningowa-kalorymetria-roznicowa-dsc/>
8. <https://www.tainstruments.com/applications-notes/studying-liposomes-in-the-nano-dsc/>

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu Katedra i Zakład Biofizyki i Neurobiologii	Ćwiczenie 9 Analiza właściwości termotropowych liposomów metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) – symulacja komputerowa	
	 Imiona i nazwiska studentów	Wydział: nr grupy: Data:
Ocena:	Podpis prowadzącego ćwiczenia	

Tabela 1

Liposom	Skład	T _m (K)	ΔT _{1/2} (K)	ΔH (kJ/mol)
L1	DPPC			
L2	DPPC: cholesterol (80:20)			
L3	DPPC: cholesterol (60:40)			
L4	DPPC: DOPC (70:30)			
L5	DPPC: DOPC: cholesterol (50:30:20)			
L6	DPPC: DOPC: cholesterol (60:20:20)			

Jak zmienia się temperatura przejścia fazowego, entalpia przemiany i szerokość połówkowa piku wraz ze wzrostem zawartości cholesterolu w liposomach? Jak można wyjaśnić zaobserwowane zmiany?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Jaki wpływ na właściwości błony lipidowej wywiera obecność DOPC? Wyjaśnij, dlaczego dodatek DOPC powoduje zmiany parametrów termogramu.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Który z analizowanych liposomów można uznać za potencjalnie korzystny jako nośnik leku przeciwnowotworowego, biorąc pod uwagę właściwości błony określone na podstawie DSC? Uzasadnij odpowiedź

.....

.....

.....

Tabela 2

Liposom	Skład	T_m (K)	$\Delta T_{1/2}$ [K]	ΔH (kJ/mol)
L7	DPPC			
L8	DPPC: cholesterol (80:20)			
L9	DPPC: cholesterol (60:40)			
L10	DPPC: DOPC (70:30)			
L11	DPPC: DOPC: cholesterol (50:30:20)			
L12	DPPC: DOPC: cholesterol (60:20:20)			

Które formułacje wykazały największą stabilność podczas przechowywania?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Jakie zmiany parametrów DSC świadczą o pogorszeniu stabilności liposomów?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Czy liposom wykazujący największą stabilność jest jednocześnie najlepszym nośnikiem leku przeciwnowotworowego? Uzasadnij odpowiedź.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....