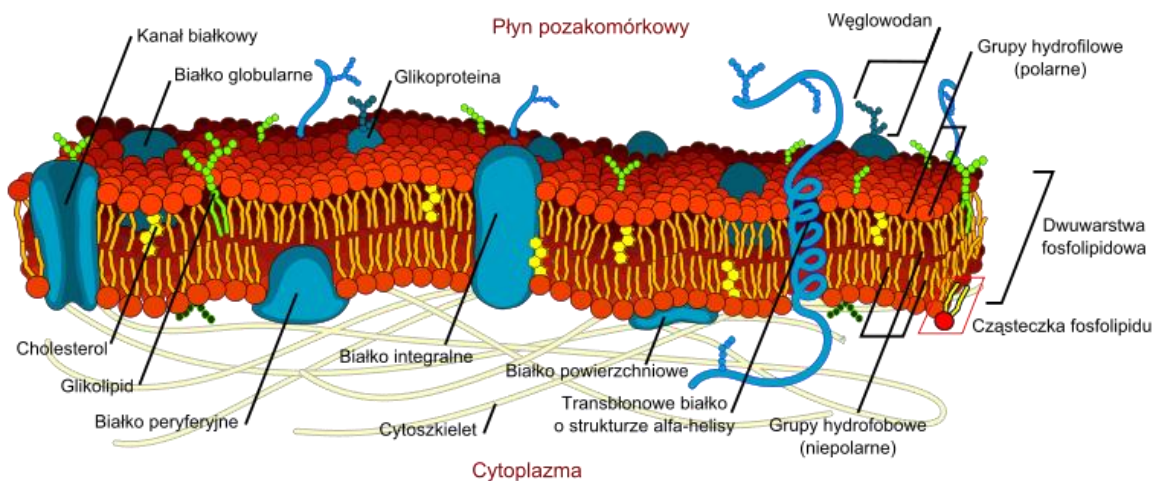


## Ćwiczenie 20

### Właściwości błon biologicznych. Liposomy, preparatyka liposomów i ich ładowanie substancją barwną. Określanie wielkości cząsteczki lipidu poprzez pomiar powierzchni warstwy monomolekularnej.

Każda komórka otoczona jest błoną komórkową, która zapewnia integralność komórki przez zachowanie charakterystycznego dla niej składu chemicznego, często różniącego się od otaczającego jej środowiska. Jednocześnie zapewnia ona wymianę materii i informacji pomiędzy komórką a jej otoczeniem. Badania składu chemicznego błon komórkowych wykazały, że jej głównymi składnikami są białka (w zależności od pełnionych funkcji przez błonę stanowią one ok. 20-70 %) i związki lipidowe. Przykładowo w osłonce mielinowej białka stanowią ok. 20 % masy suchej, a w wewnętrznej błonie mitochondrialnej aż 70 % masy błony. W błonach plazmatycznych większości komórek udział białek i lipidów jest podobny.

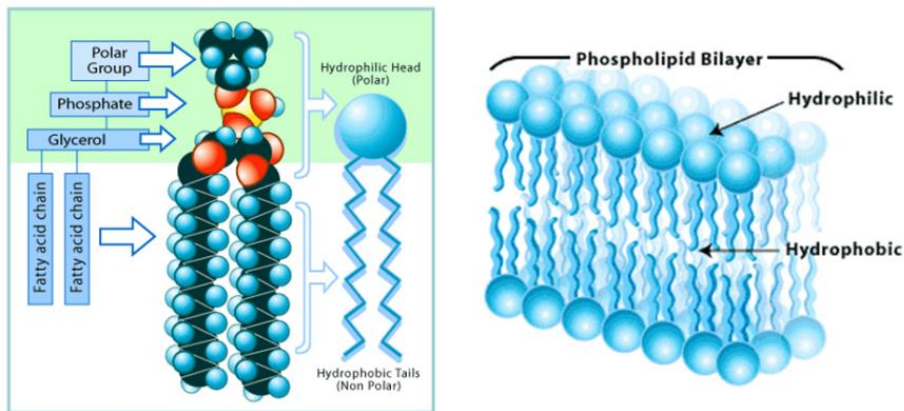
W latach 70-tych XX wieku zaproponowano tzw. *mozaikowy model budowy błon biologicznych*, według którego lipidy tworzą podwójną warstwę, w której zanurzone są białka (ryc. 1). Część białek „przebija” błonę i ich końce wystają po obu stronach dwuwarstwy lipidowej (białka integralne, transbłonowe; kanały białkowe), część natomiast jest luźniej związana z powierzchnią błony (białka powierzchniowe/peryferyjne, globularne). Białka te odpowiedzialne są za specjalistyczne funkcje pełnione przez dany typ komórek.



Ryc. 1. Mozaikowy model budowy błony

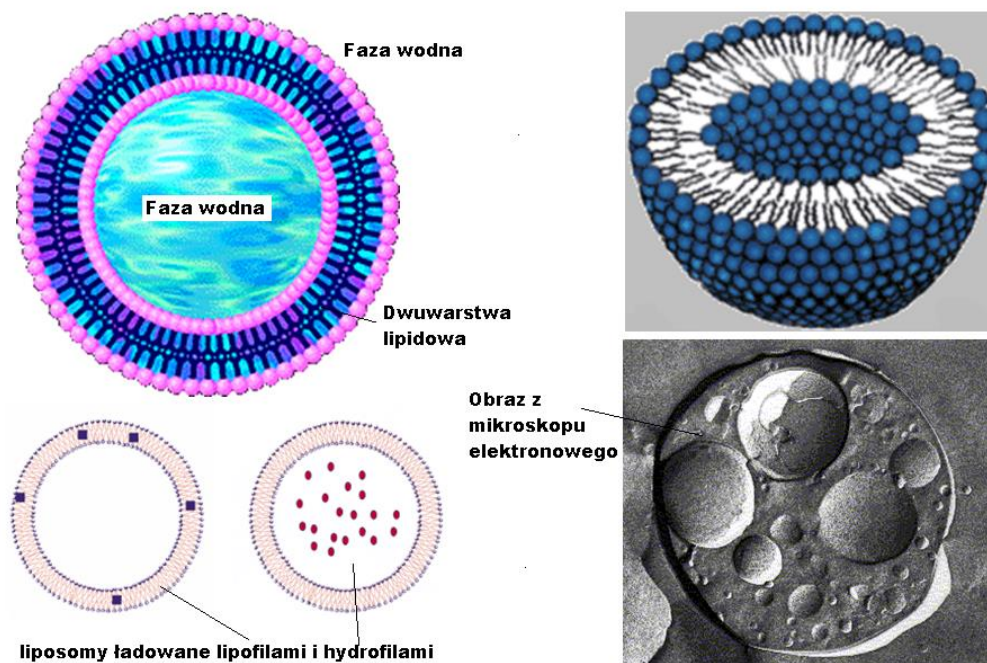
Spośród związków lipidowych tworzących zręb błony komórkowej, najbardziej liczne są fosfolipidy. Pod względem chemicznym fosfolipidy są pochodnymi kwasu fosfatydylowego, którego rdzeniem jest cząsteczka glicerolu zestryfikowana dwoma długołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi i kwasem fosforowym. Charakterystyczną cechą związków lipidowych jest ich amfifilowość, czyli dwojaki sposób oddziaływania z cząsteczkami wody. Wynika to z faktu, że reszty kwasów tłuszczowych mają charakter *hydrofobowy* (nie mają momentu dipolowego – są niepolarne), a grupa fosforanowa połączona wraz z przyłączoną do niej częścią polarną ma charakter *hydrofilowy* (ryc. 2). W środowisku wodnym strukturą energetycznie korzystną dla fosfolipidów jest taka struktura, w

której części hydrofobowe nie mają kontaktu z wodą. Dlatego też w błonie plazmatycznej hydrofobowe reszty kwasów tłuszczowych skierowane do środka, a hydrofilowe „głowy” pozostają w kontakcie z środowiskiem zewnętrznym i wewnętrznym komórki, w których woda jest jednym z integralnych składników chemicznych.



Ryc. 2. Amfifilowa cząsteczka fosfolipidu i fragment dwuwarstwy lipidowej

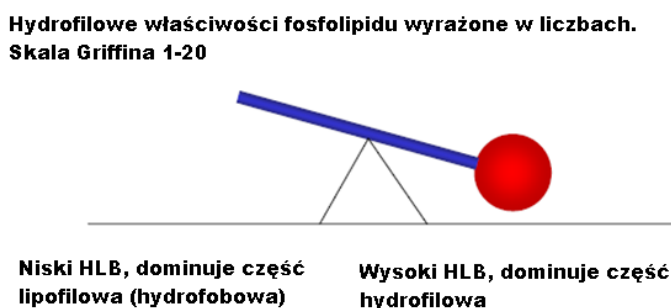
Wiele fosfolipidów, w środowisku wodnym tworzy spontaniczne, podwójne warstwy folipidowe. Do takich struktur należą **liposomy** (pęcherzyki fosfolipidowe, pęcherzyki Banghama, ang. *liposomes*), będące zamkniętymi kulistymi strukturami błonowymi. Mają one postać pęcherzyków (o wielkości 0,01-10  $\mu\text{m}$ ) wypełnionych wodą (lub roztworem wodnym) i otoczonych dwuwarstwą lipidową o strukturze analogicznej do tej występującej w błonach biologicznych (Ryc. 3).



Ryc. 3. Budowa liposomów.

Podobieństwo właściwości liposomów do właściwości błon biologicznych powoduje, że są stały się one modelowym obiektem badań właściwości błon biologicznych. Ponieważ są zbudowane z tych samych składników co błony komórkowe i swobodnie mogą przez nie przenikać (są niewielkie) to wykorzystywane są do przenoszenia różnorodnych substancji (zarówno lipofilowych, jak i hydrofilowych). To sprawia, że strukturami tymi szczególnie zainteresował się przemysł kosmetyczny i farmaceutyczny.

Liposomy powstają w wyniku spontanicznej hydratacji (uwodnienia) suchego filmu fosfolipidowego (faza hydrofobowa). Możliwość ich powstawania wynika z wyjątkowo korzystnych wartości HLB (Ryc. 4) fosfolipidów jako amfifilów oraz kształtu ich cząsteczek, dzięki czemu większość fosfolipidów preferuje tworzenie agregatów o strukturze dwuwarstwowej. Ponieważ płaska struktura dwuwarstwowa jest energetycznie niekorzystna, to powstająca dwuwarstwa lipidowa zaczyna tworzyć zamknięte struktury (o kształcie kulistym) aby zminimalizować całkowitą energię tworzonej struktury.

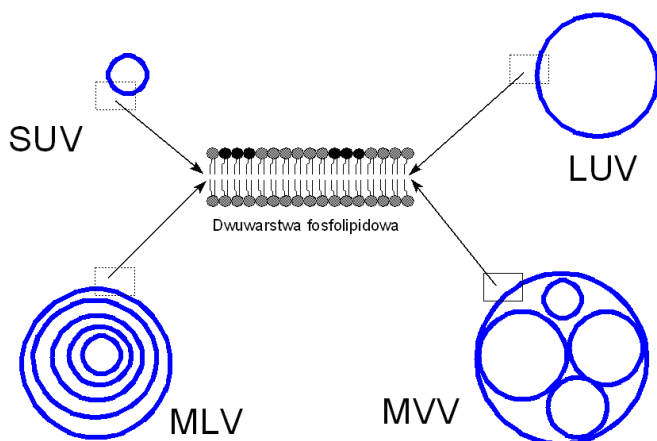


Ryc. 4. Współczynnik HLB (*ang. hydrophilic-lipophilic balance*) - równowaga hydrofilowo-lipofilowa fosfolipidu jest parametrem, mówiącym w jakim stopniu jest on hydrofilowy, czy lipofilowy. Wyznacza się go obliczając wartości tych cech dla różnych regionów cząsteczki. W skali Griffina wartość HLB równa 0 odpowiada cząsteczce całkowicie hydrofobowej, a 20 cząsteczce zbudowanej w całości z części hydrofilowych.

Liposomy występują w organizmach żywych (lipoproteiny krwi) oraz są produkowane na skalę laboratoryjną i przemysłową (wykorzystywane do produkcji leków, kosmetyków). Wyróżniamy więc liposomy sztuczne i liposomy naturalne. Liposomy sztuczne można podzielić pod względem rozmiaru, ilości warstw otoczki i sposobu wykonania na następujące grupy (ryc. 5):

- **Liposomy z więcej niż jedną warstwą lipidową**
  - liposomy wielowarstwowe (*ang. multilamellar vesicles*, **MLV**) - rozmiar:  $0,4 \div 10 \mu\text{m}$
- **Liposomy jednowarstwowe** (*ang. unilamellar vesicles*; **UV**) - rozmiar:  $0,01 \div 1 \mu\text{m}$  (wszystkie zakresy wielkości)
  - małe liposomy jednowarstwowe (*ang. small (or sonicated) unilamellar vesicles*; **SUV**) rozmiar:  $0,02 \div 0,03 \mu\text{m}$
  - duże liposomy jednowarstwowe (*ang. large unilamellar vesicles*) - **LUV** – rozmiar:  $0,05 - 1 \mu\text{m}$ .

- **Wielopęcherzykowe liposomy** (ang. *multivesicular vesicles*; **MVV**) - rozmiar:  $> 1\mu\text{m}$ .



Ryc. 5. Typy liposomów (schemat)

W warunkach naturalnych cząsteczki o charakterze hydrofobowym (lipidy, cholesterol, trójglicerydy) transportowane są w środowisku wodnym organizmu, z krwią i płynem tkankowym w postaci **cząstek - lipoprotein**. Mają one postać pęcherzyków lub dysków otoczonych podwójną lub pojedynczą warstwą lipidowej błony, zbudowanej z fosfolipidów, które otaczają hydrofilowe łańcuchy białek - apolipoproteiny

Liposomy sztuczne początkowo wykorzystywano głównie do modelowania procesów zachodzących w naturalnych błonach biologicznych. Liposomy te są bardzo stabilne, a poza tym skład ich może być określony bardzo precyzyjnie, jako że nie zawierają żadnych rozpuszczalników organicznych. Skład błon liposomów może być ciągle kontrolowany w czasie przebiegu eksperymentu. Dogodność ta wraz z dużą całkowitą powierzchnią liposomów udostępnioną dla eksperymentu decydują o tym, że liposomy wykorzystywane są przede wszystkim przy badaniu transportu małych i dużych cząsteczek nieelektrolitów przez błony, badaniu oddziaływań cząsteczek typu lipid-białko. Badania nad liposomami jako modelowymi błonami biologicznymi przyczyniły się również do rozwoju metod pozwalających na otrzymywanie różnorodnych rodzajów liposomów.

Jedne techniki są proste, lecz umożliwiają otrzymywanie liposomów składających się z wielu koncentrycznie zamkniętych przedziałów wodnych, inne natomiast dają wprawdzie twory otoczone tylko jedną dwuwarstwą, lecz o zbyt małych w porównaniu do komórki rozmiarach. Jeszcze innym powodem kontynuacji prac nad liposomami, które przekształciły się w oddzielną gałąź badań zwaną technologią liposomową, była chęć praktycznego wykorzystania zdolności zamykania substancji rozpuszczonej (roztworu) w strukturach utworzonych z naturalnych składników błon biologicznych, a więc obojętnych immunologicznie.

Głównymi celami technologii liposomowej są:

- Opracowania postępowania umożliwiającego wprowadzenie substancji do wnętrza komórek w sposób ukierunkowany i kontrolowany. Takimi substancjami przenoszonymi do wnętrza komórek mogą być np. przeciwciała, antygeny fragmenty kwasów nukleinowych, a nawet całe chromosomy. Wprowadzenie tego typu substancji umieszczonych w strukturach zamkniętych typu liposomu zapobiega m.in. niepożądanym reakcjom ubocznym i

równocześnie chroni je przed np. degradacją, której ulegałyby podczas bezpośredniego podawania.

- Opracowania takich technologii, dzięki którym dawki leków normalnie toksycznych w stanie wolnym mogłyby ulec obniżeniu przy zachowaniu tej samej lub wyższej skuteczności. Z drugiej strony niezmiernie ważnymi zagadnieniami są: poprawienie farmakodynamiki leków podawanych w liposomach, uczynienie liposomów niewykrywalnymi przez system makrofagów oraz opracowanie metody przechowywania liposomów w stanie nie zmienionym przez odpowiednio długi okres czasu.

Celem uzyskiwania określonego typu liposomów wymaganych dla konkretnych zastosowań, opracowano szereg wydajnych metod preparacji poszczególnych typów liposomów zarówno na skalę laboratoryjną, jak i przemysłową.

#### Jakie są zalety poszczególnych typów liposomów?

Liposomy wielowarstwowe (MLV) są szczególnie przydatne w przypadkach zamykania roztworów lipofilowych lub też wtedy, gdy efektywność zamykania roztworów wodnych nie jest istotna. Na skalę laboratoryjną odpowiednią techniką jest klasyczna metoda hydratacji cienkiego filmu lipidowego (opisana poniżej), która może być uzupełniona "wymiarowaniem" (przesiewaniem) uzyskanych liposomów przez przeciskanie ich przez filtry membranowe o porach określonej średnicy.

Małe jednowarstwowe liposomy (SUV), z uwagi na wąski zakres ich rozmiarów i wysoki stosunek powierzchni do objętości czyni je bardzo przydatnymi, szczególnie gdy nie jest wymagana wysoka wydajność enkapsulacji substancji hydrofilowych. Tego typu liposomy mogą być także ładowane substancjami o charakterze hydrofobowym. W tym wypadku przenoszona przez nie substancja jest zlokalizowana nie w środku liposomy lecz w jego lipidowej otoczce. Zaletą tych liposomów jest także ich zdolność penetrowania mniejszych struktur biologicznych. Do ich preparacji na skalę laboratoryjną stosuje się dezintegrację ultradźwiękami.

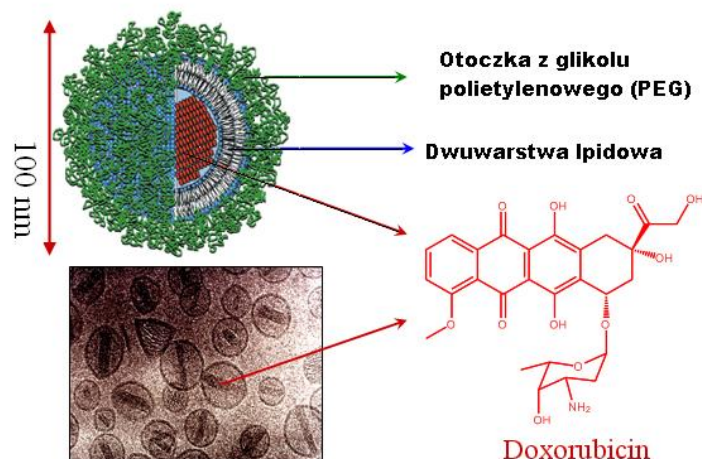
Duże jednowarstwowe liposomy (LUV) są szczególnie przydatne do wydajnego zamykania rozpuszczalnych w wodzie solutów z powodu preferującej objętość przestrzeni wodnej wartości stosunku objętości do powierzchni. Liposomy tego typu są również pożądane do rekonstrukcji białek błonowych, a także badań nad przepuszczalnością i fuzją błon.

Inny podział otrzymywanych sztucznie liposomów oparty jest na ich budowie i przeznaczeniu. Poza klasycznymi liposomami (*c-liposomes*) wyróżniamy dodatkowo *s-liposomy* (*sterically stabilized liposomes*) liposomy o przedłużonym okresie półtrwania, w których lipidowa osłonka pokryta jest glikolem polietylenowym. Tego typu liposom nie jest rozpoznawany przez komórki układu immunologicznego co umożliwia jego dłuższe przebywanie w chorej tkance. Dobrym przykładem jest tu doksil preparat liposomowy zawierający doxorubicynę wykorzystywany do niszczenia komórek nowotworowych (ryc. 6).

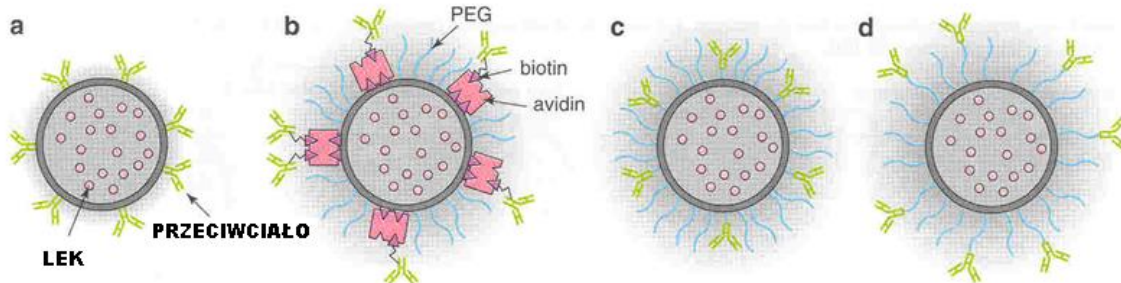
Stabilizowane liposomy wykorzystano także do produkcji immunoliposomów. W tego typu liposomach do otoczki lipidowej bezpośrednio lub pośrednio poprzez PEG lub biotynę/avidynę przyłączone są cząsteczki odpowiedniego przeciwciała.



**Liposomy S (Stealth) lub  
Liposomy PEGylowane ładowane doxorubicyną**



Immunoliposomy wykorzystuje się w przypadku terapii celowanej lekiem przeciwnowotworowym. W tym wypadku lek zawarty w środku pęcherzyka fosfolipidowego uwalnia się po dotarciu do chorej tkanki. Można również, poprzez zmianę składu, zaprojektować temperaturę, w jakiej ta lipidowa kapsułka ma uwalniać lek. Chore miejsce ma wyższą niż otoczenie temperaturę, co powoduje zwiększenie przepuszczalności ścianki liposomu i uwolnienie substancji terapeutycznej, kierując w ten sposób nośnik wraz lekiem bezpośrednio do komórek nowotworu.



Ryc. 7. Liposomy modyfikowane: a) liposom c (klasyczny) z przyłączonym przeciwciałem, b) liposom PEGylowany z przeciwciałem przyłączonym poprzez biotynę/awidynę, c) liposom PEGylowany z przeciwciałem przyłączonym bezpośrednio z otoczką, d) liposom PEGylowany z przeciwciałem przyłączonym poprzez cząsteczki glikolu polietylenowego (PEG)

Spontaniczne powstawanie pęcherzyków liposomalnych opisują dwa główne modele: model „pączkowania” oraz model „fuzji fragmentów dwuwarstwy fosfolipidowej”. W modelu „pączkowania” pęcherzyki powstają w czasie stopniowego uwadniania suchych fosfolipidów. Suche, cienkie warstewki fosfolipidów posiadają strukturę warstwową identyczną z dwuwarstwą; podczas uwadniania roztwór wodny wnika pomiędzy poszczególne dwuwarstwy powodując ich rozdzielanie i powstawanie pączkujących zaczątków

pęcherzyków. Pęcherzyki podczas mechanicznego wytrząsania hydratowanego fosfolipidu odrywają się, a jako że powstały z wielu warstw suchego fosfolipidu, stają się wielowarstwowymi liposomami. Poddanie tych pęcherzyków działaniu ultradźwięków powoduje dalsze odpączkowywanie małych, jednowarstwowych pęcherzyków. Podobnie „homogenizująco” i reorganizująco działać będzie przeciskanie dużych pęcherzyków przez małe pory filtrów membranowych. W modelu „fuzji fragmentów dwuwarstwy fosfolipidowej” intermedialnym, niezależnie od techniki stosowanej do uzyskania finalnych liposomów są mniej lub bardziej płaskie fragmenty dwuwarstwy, z których dopiero na drodze fuzji powstają zamknięte pęcherzyki, których wielkość zależy od wtórnej ich obróbki.

Do charakterystyki uzyskanych preparatów stosuje się m.in. określenie wartości tzw. objętości zamkniętej (*captured volume*) definiowanej jako objętość roztworu wodnego zamknięta przez daną ilość lipidu i jest wyrażana w litrach/mol lipidu całkowitego oraz tzw. wydajność zamykania (*encapsulation efficiency*) definiowana jako część roztworu, która jest zamknięta w liposomach. Ten drugi parametr jest wprost proporcjonalny do stężenia lipidu w preparacie liposomowym.

### **Naskórek jako miejsce podawania preparatów liposomowych**

Naskórek stanowi naturalną ochronę zarówno przed utratą substancji z jego wnętrza, jak i wnikaniem obcych cząsteczek ze środowiska. Bariera ta utrudnia, a często wręcz uniemożliwia naskórne podanie leku w postaci wolnej. W kosmetyce natomiast preparaty odżywcze działają jedynie na warstwę rogową naskórka i nie mają zdolności do przenikania w głąb. Zastosowanie liposomów pozwala ominąć ten problem. Liposomy mogą przynosić substancje czynne (witaminy, proteiny, składniki nawilżające) do wnętrza naskórka, gdzie następnie będą uwalniane i wchłaniane. Uwalnianie substancji czynnych dzięki liposomom może być w pewien sposób kontrolowane. Jest to szczególnie ważne, gdy stosuje się substancje mogące w dużych stężeniach powodować podrażnienia lub takie które mogą ulegać modyfikacjom zanim dotrą w miejsca docelowe. Dodatkowo łącząc się z powierzchniową warstwą naskórka (tzn. z warstwą rogową) wprowadzają wodę i substancje tłuszczowe, co przyczynia się do wzmocnienia jej i przywracając jej spoistość. Jeśli skóra, oprócz codziennej pielęgnacji, potrzebuje bardziej intensywnego zabiegu, to właśnie produkty z liposomami wydają się być idealnym rozwiązaniem. Do najczęściej spotykanych substancji transportowanych przez liposomy, stosowanych w preparatach kosmetycznych należą: aktywne formy witamin A, B, C, E, kwas hialuronowy, kolagen, elastyna, wyciągi z roślin, koenzym Q<sub>10</sub>, jak również tlen, który poprawia mikrokrążenie i przemianę materii w skórze. Istnieją jednak wątpliwości, czy krem w takiej postaci wniknie w głąb skóry i czy taki zabieg ma sens. Skóra bowiem dba o odpowiedni przepływ krwi, a tym samym o odpowiednie natlenienie tkanek. Niemniej jednak ponieważ udowodniono, że niedobór tlenu przyczynia się do zwiótnienia i zmęczenia skóry to zastosowanie takich preparatów z tlenem mogłoby wywierać korzystny efekt.

Liposomy pełnią nie tylko rolę nośnika leku ale mogą też być wykorzystywane jako samodzielne struktury np. do dostarczenia do miejsca podania określonego rodzaju substancji o charakterze lipidowym. Zatem zastosowanie liposomów jako nośników leku ma wiele zalet. Ułatwia to penetrację leku w najwyższych warstwach naskórka (często również głębiej)





## Wykonanie ćwiczenia

Odczynniki:

1. Asolektyna (15 mg)
2. Chloroform
3. KCl (125 mM) rozpuszczony w buforze Tris-HCl (pH 7,4)

Postępowanie:

1. Naważkę 15 mg asolektyny w probówce typu Eppendorf rozpuścić w 1 ml chloroformu i przenieść ją do kolby okrągłodennej (o pojemności 50 ml). Chloroform dodać do próbki, a następnie całość przenieść do kolby.
2. Za pomocą wyparki próżniowej odparować chloroform (włącznik zasilania powoduje uruchomienie termostatu). Delikatnie odkręcić zawór wodny w celu wprowadzenie zimnej wody do chłodnicy. Po podłączeniu kolbki okrągłodennej do pasującego szlif zestawu należy usunąć powietrze z wyparki poprzez zastosowanie pompki wodnej. Dopóki w wyparce nie panuje podciśnienie należy ręcznie podtrzymywać kolbę, która obecnie jest przytrzymywana tylko przez szlif – brak asekuracji może spowodować zsuniecie się kolby i jej rozbitcie lub upadek do znajdującej się poniżej łaźni wodnej (utrata preparatu)! Pompkę wodną uruchamia się poprzez odkręcenie niebieskiego zaworu. Wzrost wartości na manometrze przy pompce świadczy o wzrastającym podciśnieniu (próżni) w wyparce. Od tego momentu kolba będzie przytrzymywana do wyparki poprzez podciśnienie panujące w urządzeniu. Zanurzyć kolbę delikatnie pod kątem w termostatowanej łaźni wodnej (45°C - 50 °C). Przez cały czas odparowywania kolba powinna być obracana (koliste ruchy – obroty ustawiamy pokręteł na wyparce), aby substancja równomiernie rozłożyła się na ściankach kolby tworząc cienki film.
3. Przygotować 4 ml buforu Tris-HCl (pH 7,4), do którego można dodać kilka (6-10) kropeł soku z aronii, lub innej substancji wskazanej przez osobę prowadzącą ćwiczenia.
4. Po odparowaniu chloroformu (co zajmuje zazwyczaj kilka minut – określić poprzez obserwację czy w kolbie znajduje się jeszcze płynna zawartość czy już całość chloroformu została odparowana) należy zapowietrzyć wyparkę (zlikwidować próżnię poprzez przekręcenie szklanego zaworu obok białego, plastikowego węża - w górnej części wyparki za odbieralnikiem. Delikatny syk powietrza i spadek wartości podciśnienia na manometrze świadczy o wyrównywaniu ciśnień wewnątrz i na zewnątrz wyparki. Od tego momentu znów konieczna jest ręczna asekuracja kolby. Po

zlikwidowaniu próżni (wartość 0 na manometrze), wyłączyć ruch obrotowy kolby po czym delikatnie zdjąć kolbę okrągłodenną. Zamknąć kran od pompki wodnej, wyłączyć wyparkę/łaźnię i obieg wody w chłodnicy wyparki.

5. Uzyskany (wg. punktu 3) bufor przenosimy do kolby okrągłodennej z filmem lipidowym na ściankach i dokładnie mieszamy, tak aby cała warstwa lipidowa rozpuściła się. Dobre rezultaty otrzymuje się poprzez wytrząsanie lub worteksowanie (jeżeli dostępna jest mikrowytrząsarka). Wytrząsanie kontynuować przez kilka minut. Należy szczególnie uważać, aby kolba nie wypadła z ręki! Wyraźne zmętnienie buforu świadczy o powstaniu liposomów.
6. Uzyskaną zawiesinę liposomów rozdzielamy na dwie części. Jedną z nich przenosimy do probówki i poddajemy sonifikacji. Probówkę wstawiamy do lodu i wprowadzamy do niej końcówkę dezintegratora ultradźwiękowego, wcześniej dokładnie przemytą wodą z płynem, a następnie wodą destylowaną (obficie) i wytartą ligniną. Próbkę poddajemy działaniu ultradźwięków (40-60 kHz), aż do uzyskania zmniejszonego zmętnienia. Zwykle stosujemy 2-3 cykle dezintegracji po ok. 15-20 s (pomiędzy poszczególnymi cyklami wymagane są 1-2 minutowe przerwy).
7. Uzyskane liposomy oglądamy pod mikroskopem. Zalecane jest sprawdzenie różnych ustawień przesłony źródła światła (zbyt mocne światło uniemożliwi zaobserwowanie liposomów). Porównać uzyskane liposomy bezpośrednio po uwodnieniu filmu lipidowego i po zastosowaniu ultradźwięków. Opisać obserwacje.