

Laboratorní cvičení: Farmakologie Imunoterapie

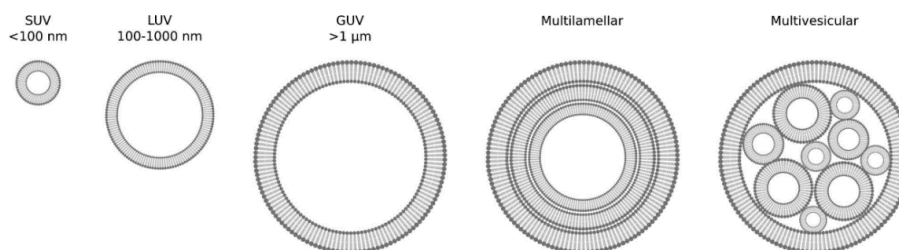
V rámci laboratorního cvičení budou připraveny různé morfologie liposomálních nanočástic, a to metodou hydratace lipidního filmu s následnou sekundární úpravou: extruze a opakované rozmražení v tekutém N₂. Do liposomálních nanočástic bude během procesu hydratace enkapsulován hovězí albumin (BSA). Metodou dynamického rozptylu světla (DLS), bude stanovena velikost, polydisperzita a koncentrace liposomů. Morfologické změny částic budou pozorovány pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM).

Teoretická část

Liposomy (Ilustrační video)

Liposomy představují uzavřené dvojvrstvé vezikuly složené z amfifilních látek, nejčastěji fosfolipidů, dosahující velikosti od zhruba 80 nm, až po mikrometrové částice. Jejich samovolný vznik ve vodném prostředí je řízen zejména hydrofobním efektem. Minimalizace entropicky nevýhodné interakce mezi acylovým řetězcem fosfolipidu a okolní vodnou fází vede k organizaci fosfolipidových molekul do dvojvrstvy a k následné vezikulaci. Strukturu ovlivňuje geometrie jednotlivých molekul. Pokud je polární část větší než nepolární acylový řetězec, molekuly se formují do struktur s velkým poloměrem zakřivení, micel. Pokud je polární a nepolární část srovnatelně velká, molekuly mají tendence tvořit dvojvrstvy. Reverzní struktury vznikají v případě menší polární části oproti acylovému řetězci¹.

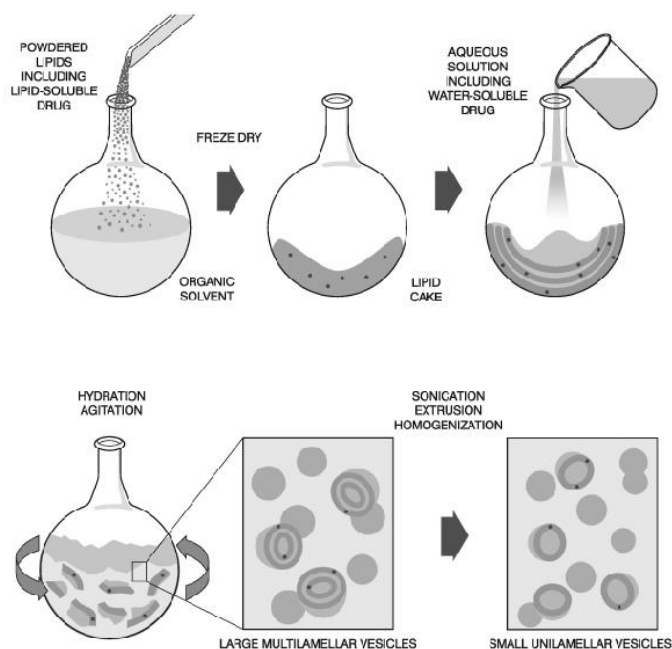
Jejich rigidita, struktura a velikost je dána jednak lipidní kompozicí a také metodou přípravy. Obecně se liposomy rozlišují dle velikosti na **SUV** (small unilamellar vesicles), **LUV** (large unilamellar vesicles) a **GUV** (gigant unilamellar vesicles). Dle počtu lamel na **unilamelární**, **multilamelární**, **multivesikulární**, **multivesikulárních multicentrické** částice (viz **Obr. 1**). Dle náboje na **neutrální**, **anionické** nebo **kationické**. Důležitým parametrem je teplota fázového přechodu, tj. teplota přechodu z uspořádaného, rigidního stavu do fluidní membrány. Tato teplota závisí na stupni nasycenosti a délce acylového řetězce, může se pohybovat od -20 °C pro nenasycený dioleoyl až po cca 55 °C pro nasycené řetězce u distearoylfosfatidylcholinu¹.



Obr. 1- Srovnání strukturních typů liposomů²

Metody přípravy lipidních nanočástic (Ilustrační video II)

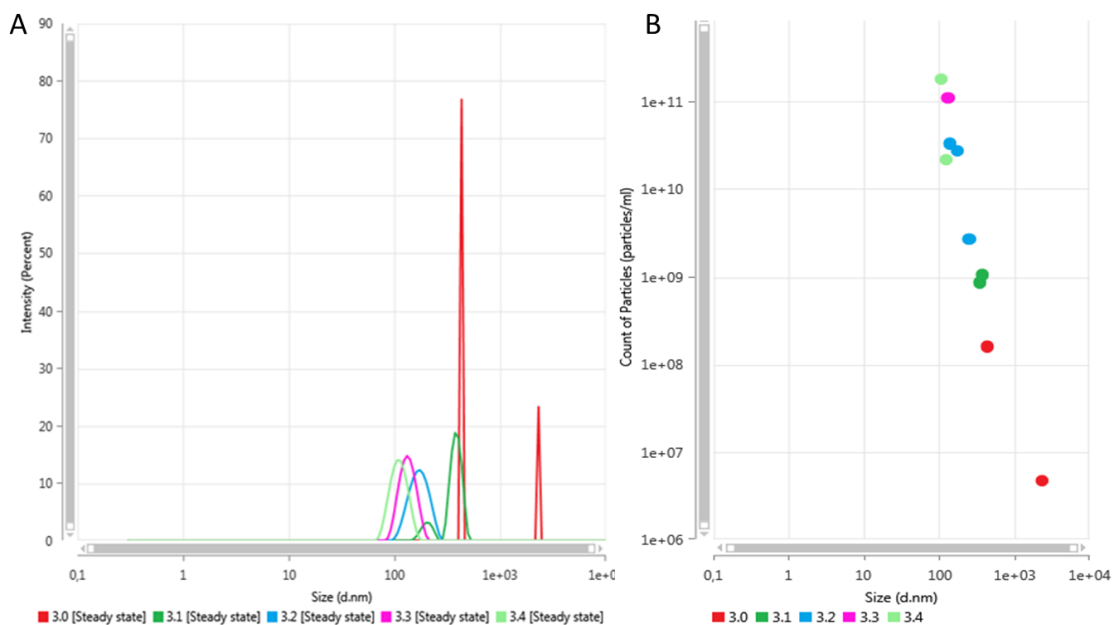
Mezi klasické metody přípravy liposomů v objemu (*batch* metody) patří zejména: **Hydratace lipidního filmu**: ([Ilustrační video zde](#)) Daná kompozice fosfolipidů je rozpuštěná v organickém rozpouštědle, nejčastěji chloroformu či ve směsi chloroform/metanol. Rozpouštědlo je následně odpařeno za sníženého tlaku v rotační vakuové odparce. Odpařením vznikne na stěně skleněné baňky tenký film jednotlivých dvojrstev fosfolipidu. Film je poté hydratován vhodným pufrům/vodným roztokem za intenzivního míchání za dané teploty, dle nejvyšší tranzitní teploty daného fosfolipidu. Takto vzniklé vezikuly se vyznačují velkou polydisperzitou a různým počtem lamel (MLV). Metodu lze doplnit mražením a rozmražením suspenze, kdy vznikají unilamelární liposomy s větším objemem enkapsulované vodné fáze. K dosažení cílené velikosti a polydisperzity/homogenity vezikul slouží další sekundární metody zejména extruze (**Obr. 3** – Manuální extrudér.), při které je suspenze liposomů opakovaně tlačena přes uniformní válcové póry polykarbonátové membrány, čímž dochází k redukci jejich velikosti dle velikosti pórů (**Obr. 4**)³.



Obr. 2 – Schéma přípravy liposomů metodou hydratace lipidního filmu se sekundární úpravou (Avanti® Polar Lipids).



Obr. 3 – Manuální extrudér.



Obr. 4 – Příklad postupného snižování velikosti (A) liposomů extruzí. 3.0 – suspenze liposomů před extruzí, 3.1 – extruze přes 400nm membránu, 3.2 – extruze přes 200nm membránu, 3.3 – extruze přes 100nm membránu a 3.4 – extruze přes 80nm membránu. (B) nárůst koncentrace částic při extruzi. Data měřená pomocí dynamického rozptylu světla, MADLS.

Další možností přípravy liposomů je **Mikrofluidní** metoda, výsledkem které jsou lipidní nanočástice (LNP) s přesně navrhnutou strukturou a vysokou mírou enkapsulované látky (například RNA). Princip je založen na laminárním mísení organické (lipidní) a vodné fáze v kapiláře o daném průtoku a pod konkrétním úhlem. Laminární, či turbulentní proudění je dáno Reynoldsovým číslem dle rovnice:

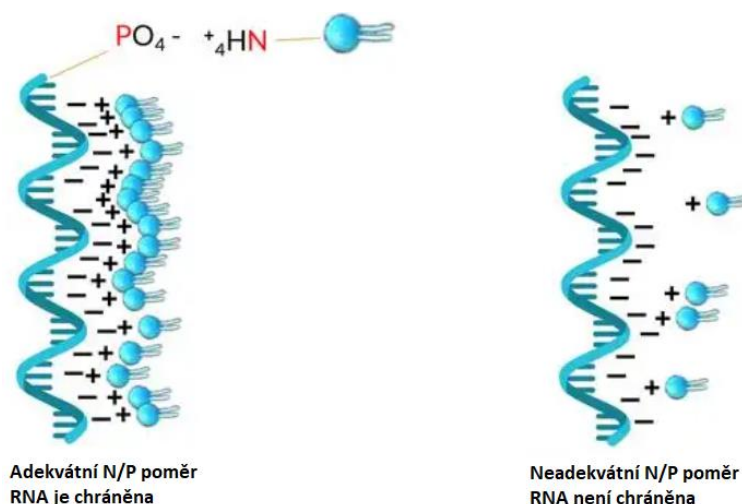
$$Re = \frac{\rho V D}{\mu} \quad (1)$$

kde ρ – hustota tekutiny; V – rychlost tekutiny; D – průměr kapiláry; μ - dynamická viskozita tekutiny. Pro hodnoty $Re < 2100$ se jedná o laminární proudění, které zajišťuje homogenní míchání s vysokou mírou opakovatelnosti. Pod odkazem naleznete ilustrační video [Reynoldsův experiment](#).

Při míchání je liposom sestavován postupně zevnitř vlivem elektrostatické interakce kladného náboje na kationickém fosfolipidu a záporného náboje na modelové molekule RNA. Interakcí se zformuje nejprve „jádro“ částice. Ostatní lipidy se zformují okolo jádra. Video od komerční firmy pro ukázkou: [Ilustrační video Mikrofluidiky](#).

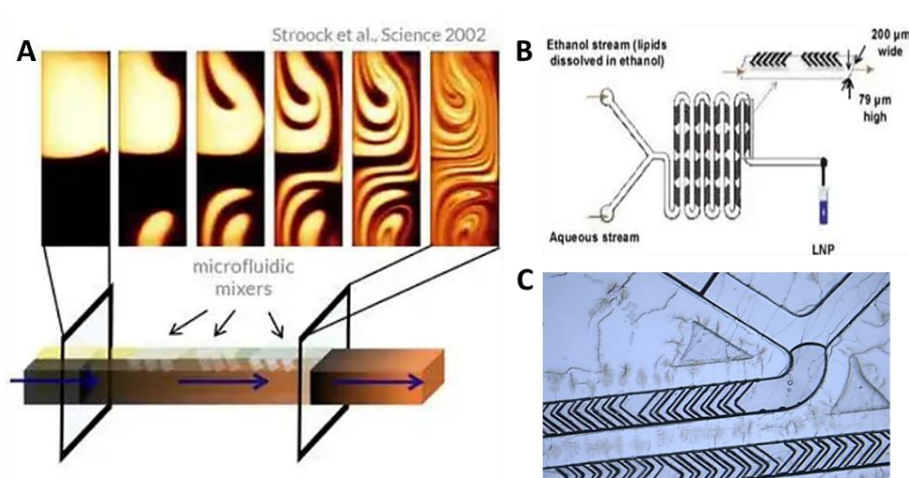
Důležitým faktorem určujícím enkapsulační efektivitu (EE) a biologickou aktivitu LNP je N/P poměr. Jedná se o molární poměr mezi aminy (N, kladné v nízkém pH) na lipidech a fosfáty (P, záporné) na struktuře RNA. N/P poměr se mění v závislosti na formulaci, nelze tedy určit jeden optimální poměr pro všechny formulace. Nižší N/P poměr vede k většímu objemu

enkapsulované látky, nicméně by nikdy neměl být 1:1, neboť by kladný náboj nestačil pro ochranu RNA.



Obr. 5 – Schéma spojení RNA(-) s lipidy (+) a vytvoření adekvátního N/P poměru pro ochranu RNA (©2020 Precision nanosystems inc.).

Napříč dalšími faktory je třeba zmínit parametry mixování, které ovlivňují charakteristiky částice, jako je velikost či polydisperzní index (PDI). Celkový průtok (TFR) a Průtokový poměr (FRR) jsou nejlépe ovlivňující parametry ladění pro dosažení optimálních částic pro danou aplikaci. Obecně se dá říct, že vyšší TFR a FRR koresponduje s menšími částicemi.



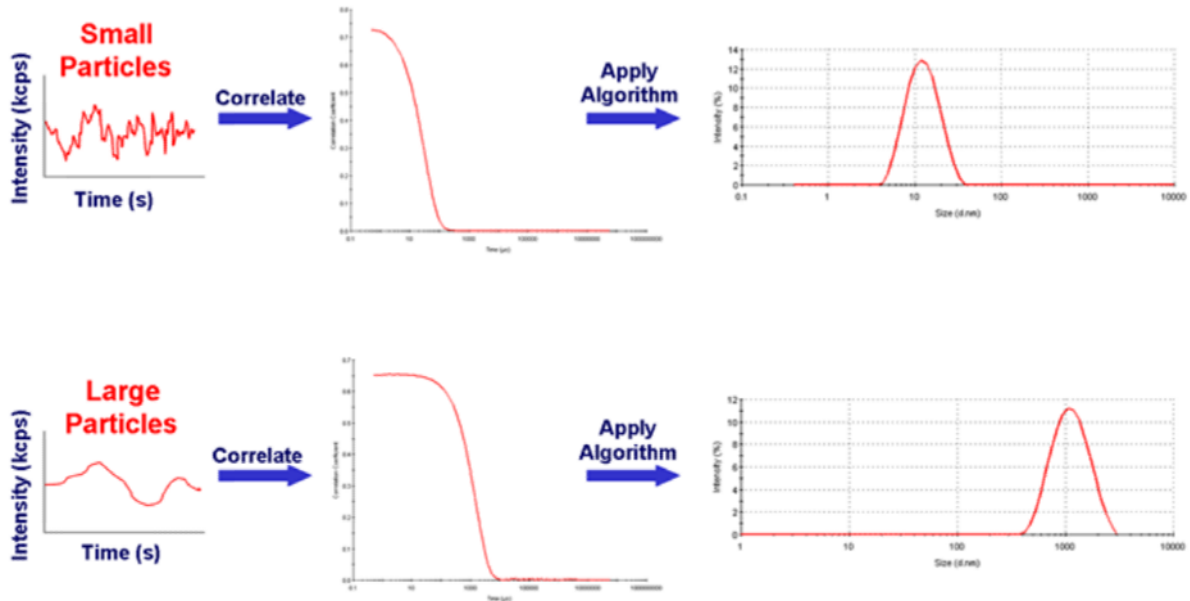
Obr. 5 – Schéma mikrofluidní kazety (B) a jejího výřezu pro ukázkou laminárního proudění (A) (©2020 Precision nanosystems inc.); Detail mikrofluidního kanálku (C)

Dynamický rozptyl světla ([Ilustrační video III](#))

Metoda dynamického rozptylu světla ((DLS – z anglického Dynamic Light Scattering), dává do korelace Brownův pohyb s velikostí částic. Brownův pohyb je náhodný pohyb částic vyvolaný tepelným pohybem rozpouštědla, které naráží do částic analytu. Rozptýlené záření (v našem případě červený laser, 633 nm) v určitém čase různými částicemi vykazuje fázový posun a jednotlivé paprsky vzájemně interagují. Interakce může být pozitivní nebo negativní a to

v závislosti na vzájemné pozici částic. Za daný časový úsek částice změni svoji polohu právě díky Brownovu pohybu. Malé částice jsou tímto pohybem ovlivněny více než částice velké. Protože se tak změni vzájemná pozice částic, změni se i fázový posun a tím celková intenzita rozptýleného záření. Vzdálenost částic od detektoru se v čase neustále měni a tím se neustále měni intenzita rozptýleného světla. Fluktuační intenzity koreluje s rychlostí pohybu částic. Pro malé částice, pohybující se rychle, bude i větší míra fluktuační intenzity rozptýleného záření, než v případě velkých, pomaleji se pohybujících částic^{4,5}.

Měření takových změn intenzit je vyjádřeno autokorelační funkcí. Zařízení, korelátor, posuzuje míru podobnosti mezi dvěma signály za krátké časové úseky (viz **Obr. 6**).



Obr. 6 – Schématické znázornění fluktuační intenzity rozptýleného záření jako funkce času⁴.

Počáteční intenzita rozptýleného světla je postupně porovnávána s intenzitou v čase $t + dt$, $t + 2dt$, $t + 3dt$ až $t = \infty$. Časové úseky (dt) jsou v řádu nanosekund/mikrosekund. Jednotlivé intenzity se od sebe v čase odchyľují, v čase $t = \infty$ je myšleno čas v řádu desítek milisekund, kdy už nedochází ke korelaci, korelační faktor se rovná nule. Oproti tomu pro ideální korelaci se korelační faktor rovná jedné. Graf závislosti korelační funkce na čase se nazývá *korelogram*. Čas, ve kterém začne korelační funkce prudce klesat, je vyjádřením průměrné velikosti částic vzorku. Sklon křivky je pak charakteristický pro polydisperzitu vzorku⁴.

Korelační funkce

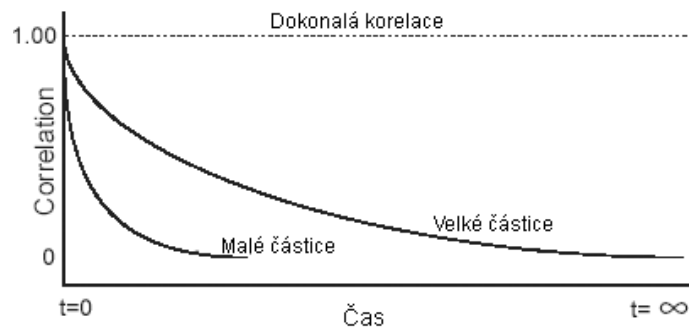
Pro monodisperzní částice má korelační funkce G exponenciální tvar a je vyjádřena rovnicí:

$$G(\tau) = [1 + B \cdot \exp(-2D\mu^2\tau)],$$

$$\mu = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right), \quad (2)$$

kde τ je časová prodleva mezi jednotlivým záznamem, B je amplituda funkce, rychlost pohybu částic, způsobená Brownovým pohybem, je vyjádřena difuzním koeficientem D , n je index lomu disperzního prostředí, λ_0 je vlnová délka laseru a θ je úhel pozorování vzhledem k počátečnímu paprsku⁴.

Pro polydisperzní vzorky se do rovnice (2) zavádí suma všech exponenciálních poklesů zahrnutých v korelační funkci.



Obr. 7 – Příklad korelační funkce pro malé a velké částice⁴.

Velikost částic je vypočítána z translačního difuzního koeficientu použitím Stokes-Einsteinovy rovnice:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (3)$$

kde R_h je hydrodynamický poloměr, D je difuzní koeficient, k je Boltzmanova konstanta, T je teplota a η je viskozita prostředí.

Hydrodynamický poloměr představuje aproximaci, jejíž hodnota referuje ke kulové částici o daném průměru, která má stejný difuzní koeficient jako analyt. Difuzní koeficient není závislý jen na jádru částice, ale také na její struktuře, koncentraci a iontové síle. Celková koncentrace iontů v roztoku ovlivňuje rychlost difuzního pohybu částice, a to změnou tloušťky elektrické dvojvrstvy, Debyeovy délky. Zvětšení elektrické dvojvrstvy zapříčiní snížení rychlosti difuze, částice se poté jeví větší⁴.

Distribuční analýza

Analýzou korelační funkce lze získat jednak střední velikost částic (z -average) a vyjádření distribuce (index polydisperzity) metodou Analýza kumulantů (Cumulants analysis). Další, nezávislou analýzou korelační funkce získáváme rovněž distribuci velikosti analyzovaného koloidu. Takto získaná velikost je vyjádřena jako závislost relativní intenzity rozptýleného světla na různých velikostech analytu. Kromě *distribuce intensity* rozlišujeme distribuci dle objemu a počtu. Distribuce dle intenzity bude vyjádřena⁶:

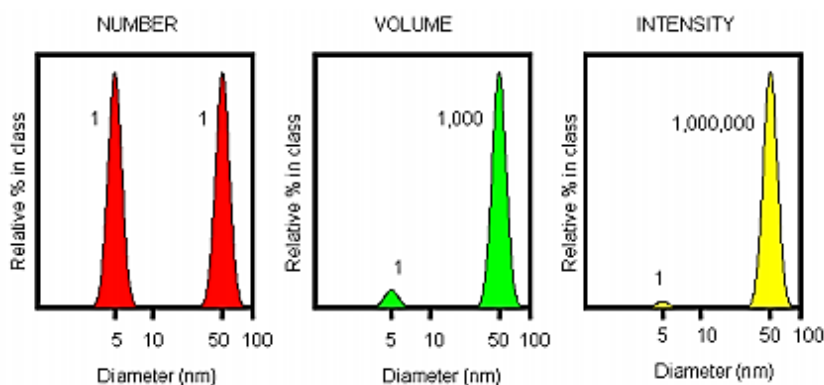
$$\%I_a = \frac{100 N_a a^6}{N_a a^6 + N_b b^6} \quad (4)$$

kde N_a je počet částic frakce a , $\%I_a$ vyjadřuje relativní intenzitu částic o velikosti a , obdobně počet částic N_b pro velikost b . Rozdíl intenzity rozptýleného světla populací a a b se bude lišit v poměru 1:1 000 000. Poměr plyne z Rayleighho aproximace, kdy je rozptýlené světlo úměrné průměru částic d^6 . Pro stejný případ dvou populací bude *distribuce objemu*, relativní objem částice V_a o velikosti a je vyjádřena⁶:

$$\%V_a = \frac{100 N_a a^3}{N_a a^3 + N_b b^3} \quad (5)$$

Jednotlivé populace se budou lišit v poměru 1:1000, poměr plyne ze závislosti objemu koule, která je úměrný průměru částic d^3 . Posledním typem je *distribuce počtu*, kde jednotlivé populace budou v poměru 1:1⁶:

$$\%N_a = \frac{100 N_a}{N_a + N_b} \quad (6)$$

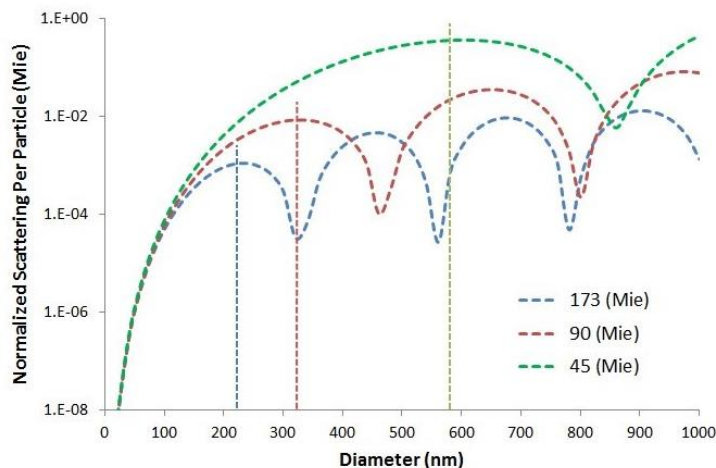


Obr. 8 – Příklad teoretického rozdělení dvou částic o velikosti 5 a 50 nm dle počtu (červená), objemu (zelená) a intenzity (žlutá)⁶.

MADLS (Multi-angle dynamic light scattering) [\(Ilustrační video IV\)](#)

Technika MADLS rozšiřuje metodu DLS o dva měrné úhly. *Back scattering* 173°, nejčastěji užívaný v DLS, kombinuje se *Side scattering* 90° a *Forward scattering* 12°. Limitace plynoucí z použití jednoho měrného úhlu popisuje Mieho rozptyl tj., asymetrický rozptyl světla na částicích větších, než je 1/20 vlnové délky použitého světla, s převahou šíření ve směru původního paprsku (viz **Obr. 9**). Na schématu jsou viditelná intenzitní minima a maxima. Částice, spadající svojí velikostí do oblastí minima, budou vykazovat nízkou intenzitu rozptýleného světla, a nízkou míru rozlišení. Kombinací tří úhlů lze minimalizovat limitace plynoucí z Mieho rozptylu a ze závislosti intenzity rozptýleného světla na velikosti, která roste se šestou mocninou průměru částice MADLS umožňuje rozlišit rozptýlené světlo pocházející z relativně malých částic, u kterých dostáváme nízký signál pro *forward scattering*, ale lze je dobře rozlišit v *back scattering* a *side scattering*, od rozptylu pocházejícího od velkých částic

o nízké koncentraci v oblasti Mieho minima, které jsou pro *back scattering* a *side scattering* v oblasti nízké intenzity^{7,8}.

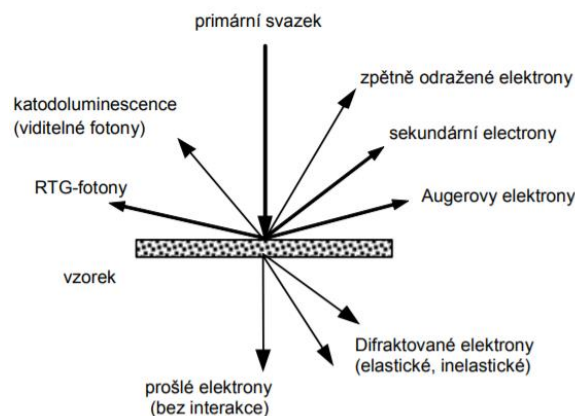


Obr. 9 – Porovnání intenzity Mieho rozptylu při různých úhlech⁸.

Oproti DLS, zavádí MADLS také tzv. adaptivní korelaci, která porovná jednotlivé koreogramy a izoluje ty, u kterých se projevují náhodné události, které nevypovídají o celkové povaze vzorku, například výskyt prachové částice. S rostoucí citlivostí tj., se zmenšujícím se objemem, ze kterého je snímán rozptyl světla, roste pravděpodobnost těchto událostí. Adaptivní korelace tyto náhodné události izoluje, což se projeví na kvalitě výsledné korelační křivky. Kombinací intenzity rozptýleného světla ze všech tří úhlů spolu s velikostí částic a z informací o indexu lomu částic a prostředí, umožňuje technika MADLS vypočítat koncentraci částic v objemu⁸.

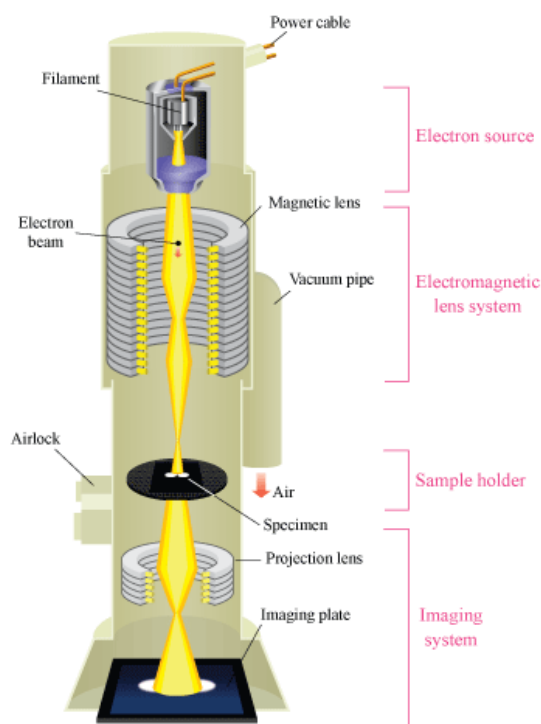
Transmisní elektronová mikroskopie TEM (Ilustrační video VI)

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) je mikroskopická metoda, při které je preparát (tenký řez o tloušťce cca 100 nm nebo suspenze částic uchycená na mřížce) ozařován paprskem elektronů. Primární elektrony jsou emitovány z katody, tenkého wolframového vlákna (o průměru cca 0,1 mm) tvarovaného do písmene „V“. Katoda je žhavana na mezní teplotu (cca 2800 K), při překročení této teploty dochází k termoemisi elektronů. Kromě termoemise rozlišujeme také autoemisní generování elektronů, kdy je naproti studené katodě ve tvaru hrotu umístěna elektroda s vysokým napětím. Vzniklé silné elektrické pole uvolňuje elektrony z povrchu hrotu. Pro termoemisní princip je vyžadováno vakuum v rozmezí 10^{-3} až 10^{-5} Pa, pro autoemisní princip pak vakuum 10^{-7} až 10^{-8} Pa. Vlákno katody je vystředěno do otvoru tzv. Wehneltova válce. Primární elektrony jsou „odsávány“ z otvoru Wehneltova válce ke kruhové anodě. Elektrony mající správný směr jsou urychlovány dále do tubusu k čočkám. Elektromagnetické čočky elektrony fokusují do tenkého svazku a udržují jejich trajektorii, takto fokusované primární elektrony interagují se vzorkem. Interakcí dochází k pružným a nepružným rozptylům (**Obr. 10**).



Obr. 10 – Schéma interakce primárního paprsku elektronů se vzorkem.

Při pružném rozptylu primární elektrony interagují s jádry atomu, vlivem interakce jsou elektrony odchýleny od původní trajektorie. Při nepružném rozptylu pak primární elektrony interagují s elektrony v elektronovém obalu, a tím tyto elektrony přechodně excitují. Tento primární proces excitace se využívá v elektronové spektroskopii (Electron Energy Loss Spectroscopy - EELS). Různé typy deexcitace, příkladem RTG emise, emise Augerových elektronů, katodoluminiscence, umožňují spojit, strukturní informace vzorku s informacemi o jejím složení nebo elektronových charakteristikách.



Obr. 11 – Schématické znázornění principu Transmisní elektronové mikroskopie⁹.

Pro zobrazení vzorkem prošlých elektronů je třeba převést elektrony do oblasti viditelného světla. K tomuto účelu slouží stínítko (pokryto ZnS), které, v závislosti na intenzitě dopadajících elektronů, převádí signál na viditelné světlo (nejčastěji okolo 550 nm). Snímky jsou následně získány pomocí CCD kamery⁹.

Experimentální část

1. PBS pufr: 10mM Na_2HPO_4 1,78 g; 1,8 mM KH_2PO_4 0,245 g; 2,7 mM KCl 0,20 g; 137mM NaCl 8,01 g v 1 litru H_2O .
2. BSA: 10 mg proteinu do 1 ml PBS

Příprava liposomů metodou hydratace lipidního filmu

- 1) Postupně, do dvou jednotlivých zábrusových baněk s kulatým dnem bude naváženo dané množství jednotlivých lipidů dle kompozice EPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine) /Cholesterol v molárním poměru 75/25, které bude následně rozpuštěno v chloroformu tak, aby výsledná koncentrace v každé baňce činila 1 mg/ml celkového lipidu.
- 2) Pomocí vakuové odparky, za stálého otáčení a zvýšené teploty opařeno rozpouštědlo za vzniku lipidního filmu
- 3) Takto vzniknou dva lipidní filmy, které budou následně hydratovány:
 - a. Do baňky bude napipetován 1 ml pufru PBS, za stálého míchání dojde k uvolnění lipidního filmu
 - b. Do druhé baňky bude napipetován 1 ml roztoku hovězího albuminu v PBS o koncentraci 10 mg/ml, po uvolnění lipidního filmu bude směs opakovaně zamrazena a rozmrazena v tekutém dusíku v počtu 5 cyklů.
- 4) Jednotlivé vzorky budou dále opakovaně extrudovány přes polykarbonátovou membránu, 200 nm.

Příprava liposomů metodou mikrofluidního směšování

- 1) Dle požadované kompozice bude naváženo požadované množství jednotlivých lipidů, tak, aby výsledná koncentrace po rozpuštění v etanolu byla 4 mg/ml. Takto bude připravena organická fáze. Jako vodná fáze bude sloužit Milli-Q voda.
- 2) Jednotlivé roztoky budou nasáty do plastových injekčních stříkaček a umístěny do mikrofluidního čipu.
- 3) Procesní parametry na přístroji Benchtop: TFR 7 ml/min, FRR 3:1.

Charakterizace pomocí DLS

- 1) Pipetou bude přeneseno cca 70 μl suspenze liposomů do čisté křemenné kyvety
- 2) Vzorky budou postupně proměřeny za konstantní teploty 25 °C v duplikátu pod úhlem 173°, *back scatter*, 90° *side scatter* a 12,3° *forward scatter*.

Charakterizace pomocí TEM

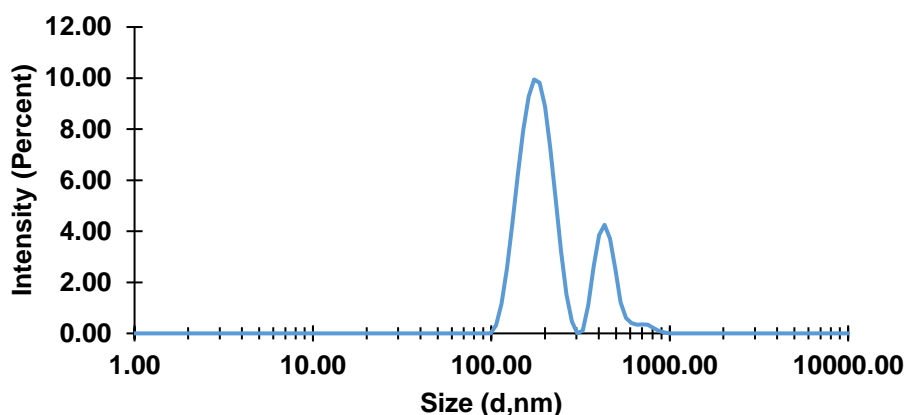
- 1) Kapka suspenze liposomů bude umístěna na mřížku
- 2) Asi po jedné minutě bude pomocí filtračního papíru z mřížky odstraněn zbylý roztok
- 3) Vzorek bude barven 2% roztokem kyseliny fosfowolframové či molybdenanem amonným.
- 4) Přebytek kyseliny bude vysušen filtračním papírem.
- 5) Vzorky budou pozorovány při zvětšení 7 500 \times a zrychlovacím napětím 80 kV.

Literatura

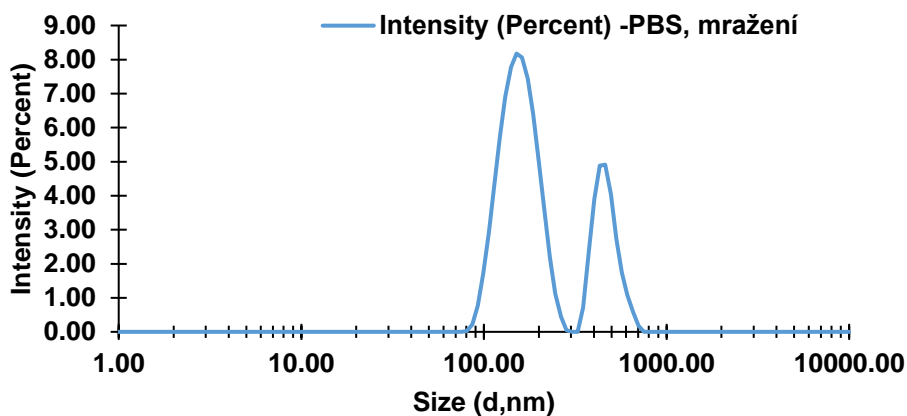
1. Lasic, D. D. *Liposomes in gene delivery*. (CRC Press, 1997).
2. Van Swaay, D. & Demello, A. Microfluidic methods for forming liposomes. *Lab Chip* **13**, 752–767 (2013).
3. Bangham, A. D., Hill, M. W. & Miller, N. G. A. *Methods in Membrane Biology*. (Plenum Press, 1974). doi:10.1007/978-1-4615-8960-0.
4. Malvern Panalytical Ltd. Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes. 1–8 (2000).
5. Kaszuba, M. Dynamic and Electrophoretic Light Scattering Overview. 1–11 (2017).
6. Malvern Instruments. Dynamic Light Scattering. *Technical note* 15 <https://www.malvernpanalytical.com/en/support> (2014).
7. Cummins, P. G. & Staples, E. J. Particle size distributions determined by a “multiangle” analysis of photon correlation spectroscopy data. *Langmuir* **3**, 1109–1113 (1987).
8. Malvern Panalytical Ltd. Improved component resolution with Multi- Angle DLS (MADLS). 1–14 (2018).
9. Atomic World - Transmission electron microscope(TEM) - Principle of TEM. http://www.hk-phy.org/atomic_world/tem/tem02_e.html.

Vyhodnocení a ukázka dat

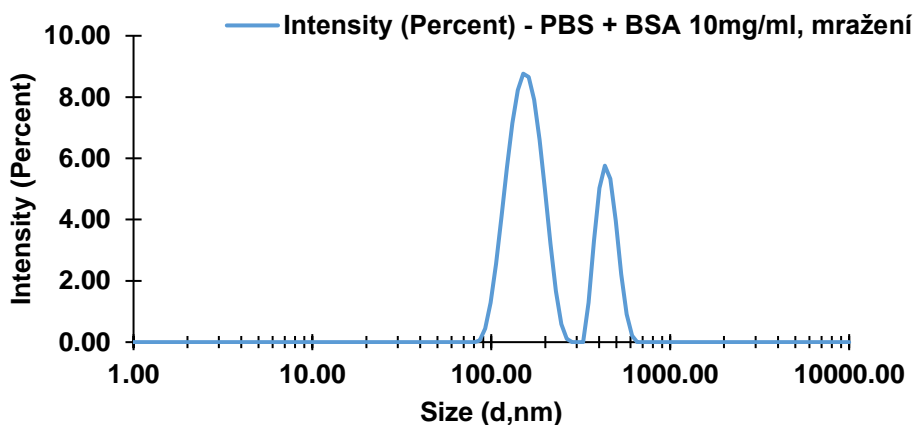
Výsledky měření DLS/MADLS



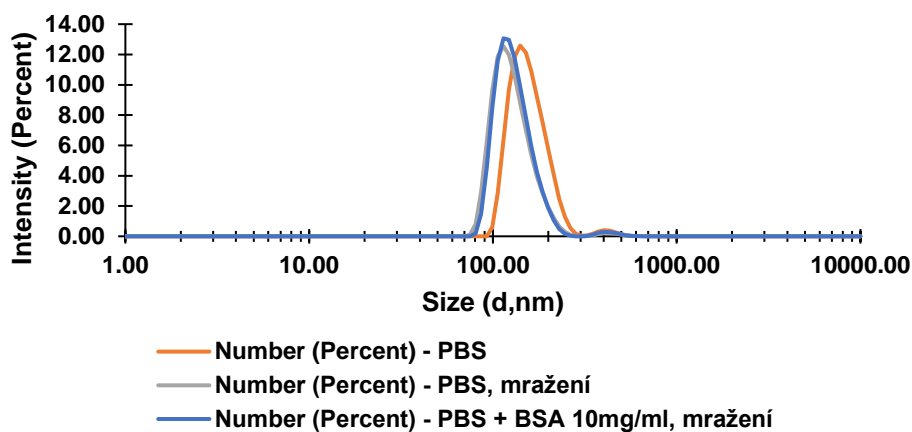
Obr. 12 – MADLS Data, Intensity distribution: Liposomy hydratované PBS, po extruzi



Obr. 13 – MADLS Data, Intensity distribution: Liposomy hydratované PBS, po extruzi a opakovaném rozmražení/ zamražení v tekutím dusíku.



Obr. 14 – MADLS Data, Intensity distribution: Liposomy hydratované roztokem 10 mg/ml BSA v PBS, po extruzi a opakovaném rozmražení/ zamražení v tekutím dusíku.

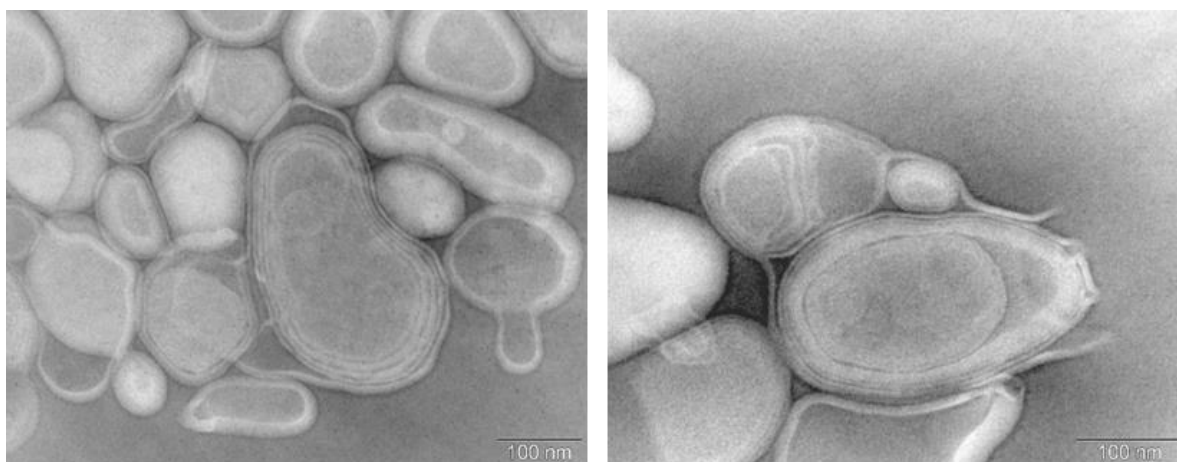


Obr. 15 – MADLS Data, Number distribuce: Liposomy hydratované PBS bez mražení, Liposomy hydratované PBS opakovaně zamražené v N_2 , Liposomy hydratované 10 mg/ml BSA s opakovaným cyklem zamražení v N_2 .

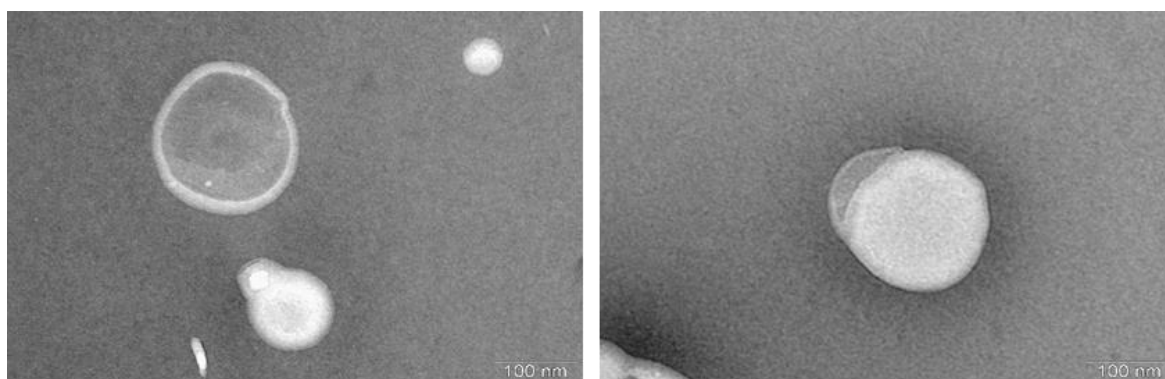
Tabulka 1 – souhrnná tabulka DLS měření,

	z-average (d.nm)	PdI	Total Number Concentration (particles/ml)
Liposomy - PBS	193	0,231	4,28E+10
Liposomy - PBS, mražení	188	0,260	8,46E+10
Liposomy - PBS + BSA 10mg/ml, mražení	178	0,313	9,90E+10

Výsledky obrazové analýzy TEM



Obr. 16 – TEM snímky liposomů bez úpravy rozmražením v tekutém dusíku



Obr. 17 – TEM snímky liposomů po opakovaném rozmrazování/zamrazování v N_2