

www.bioscope.ffh.bg.ac.rs



Primena EPR spektroskopije za ispitivanje transporta lipozoma kroz kožu

¹Nakarada DjJ, ^{1,2}Markovic SZ, ²Kastratovic DA, ¹Mojovic MD

Miloš D. Mojović

XV Nedelja bolničke kliničke farmakologije
23-24.decembar 2023.

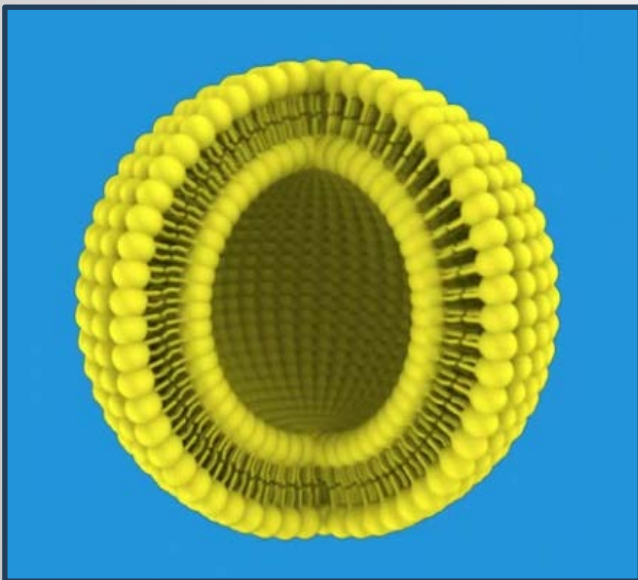
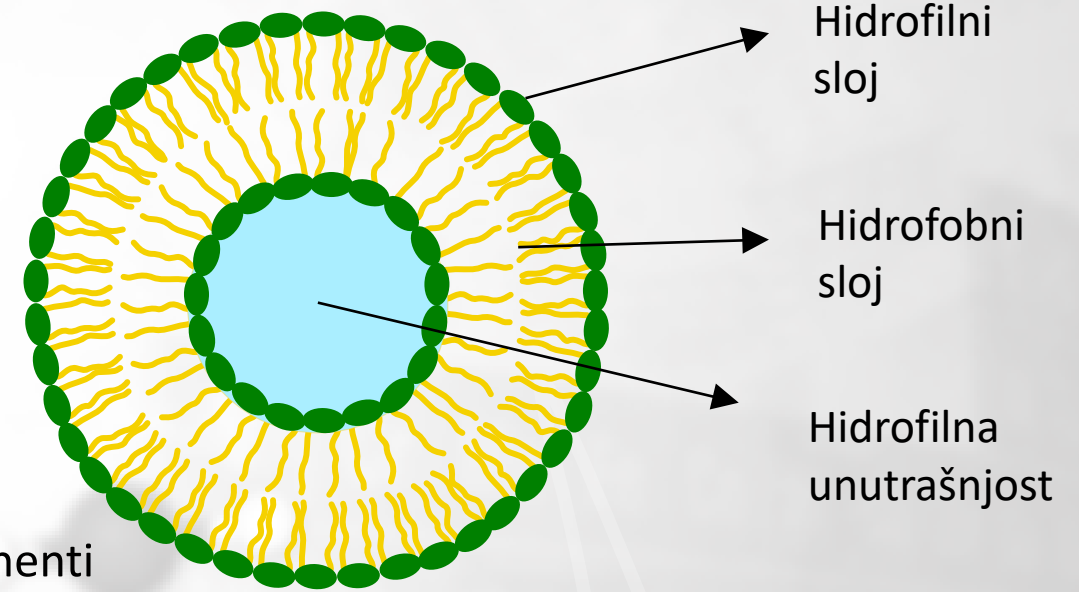
Sekcija za kliničku farmakologiju “dr Srdjan Djani
Marković”, Srpsko lekarsko društvo

milos@ffh.bg.ac.rs

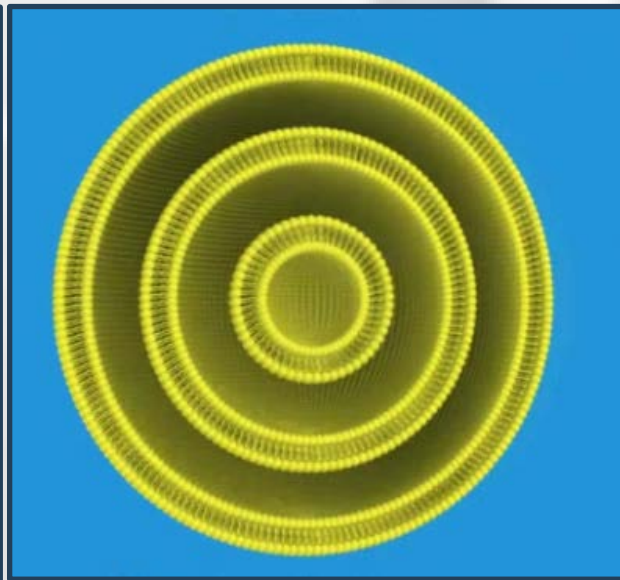


Zašto lipozomi?

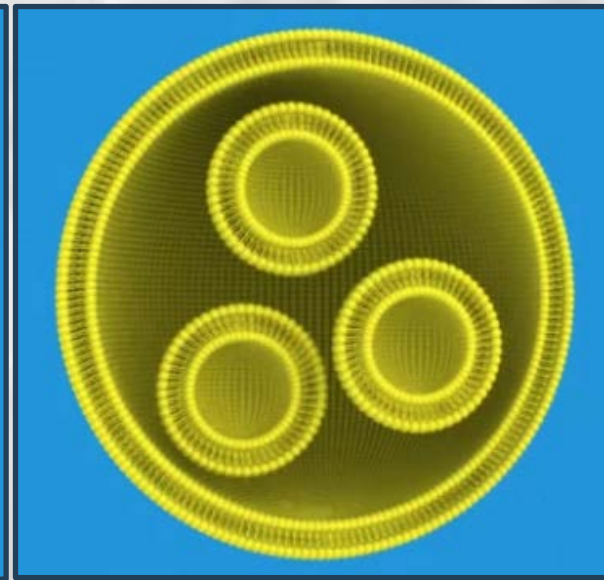
- Prirodni lipidi, biokompatibilni i biodegradabilni
- Različite termalne i pH-stabilnosti (u zavisnosti od sastava)
- Jednoslojni, višeslojni, multivezikularni
- Moguće kontrolisano oslobađanje leka
- Moguća implementacija hidrofилnih i hidrofobnih aktivnih komponenti



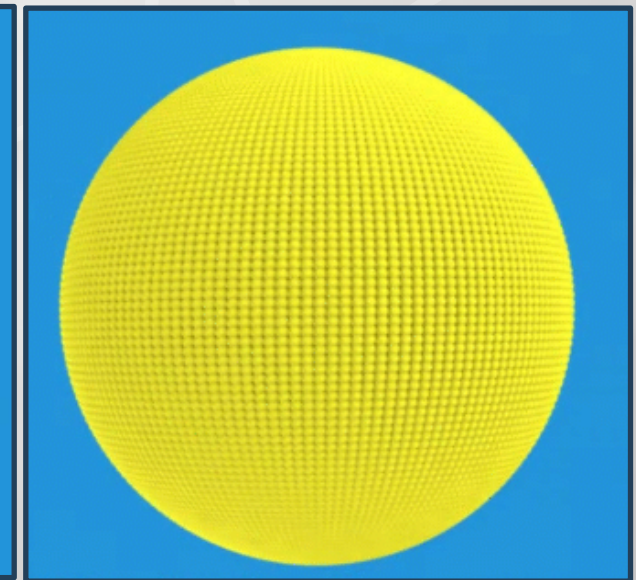
Lipozom



Višeslojni lipozom



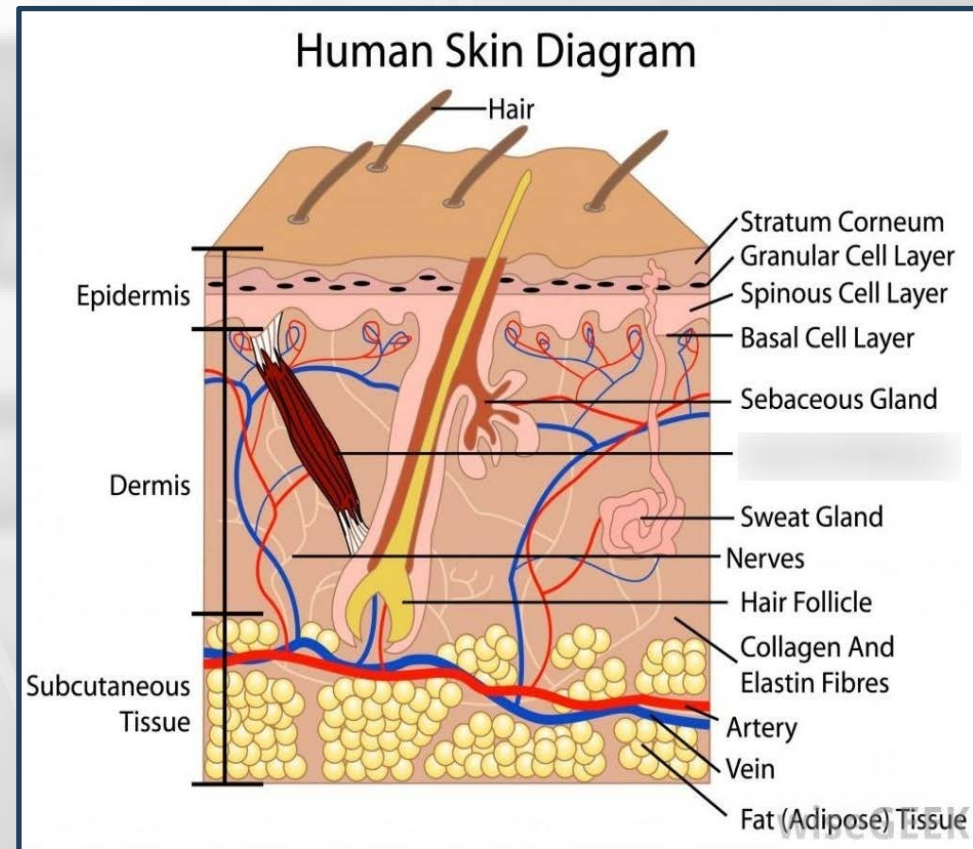
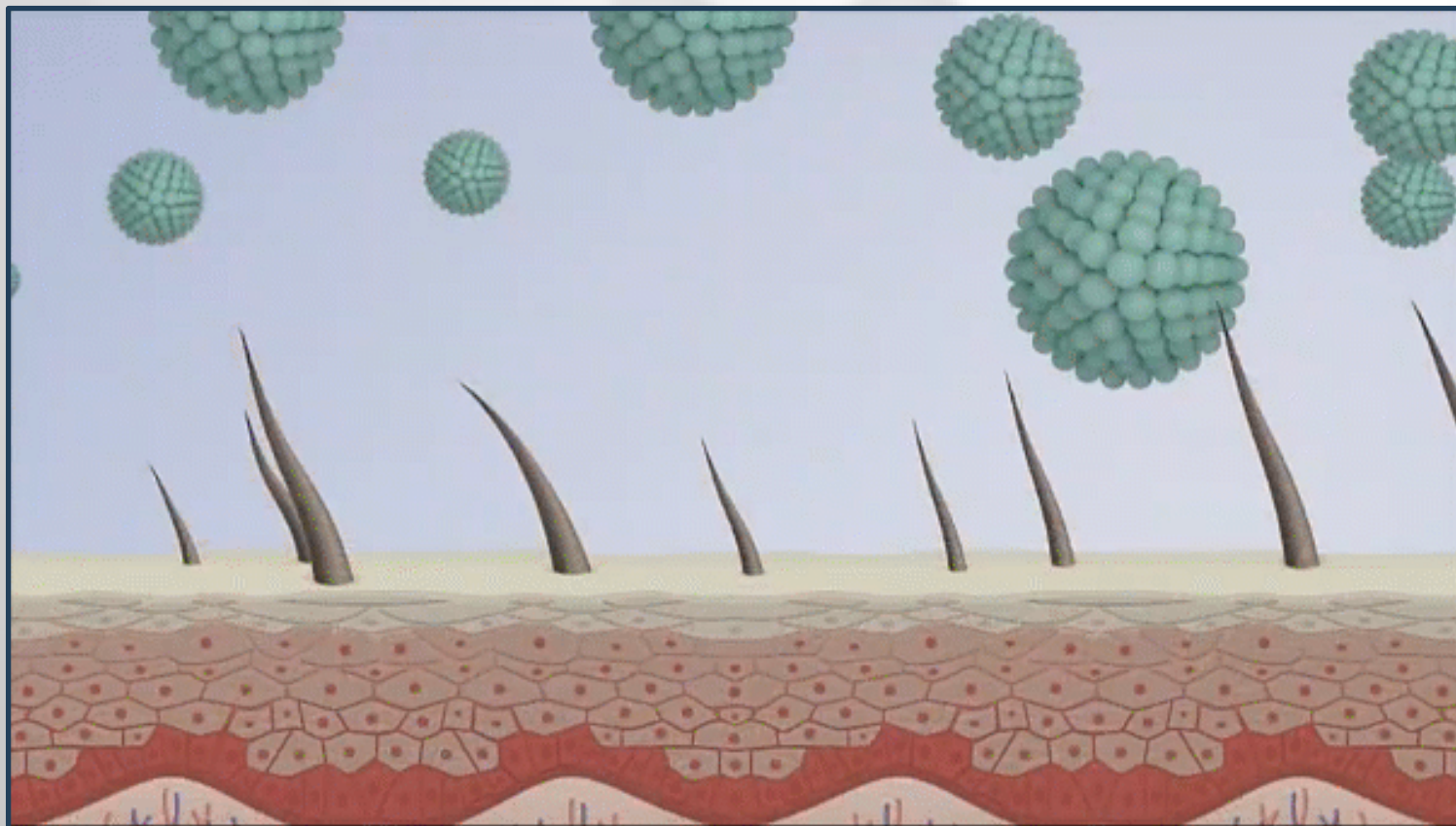
Multivezikularni lipozom



Postepeno oslobađanje leka

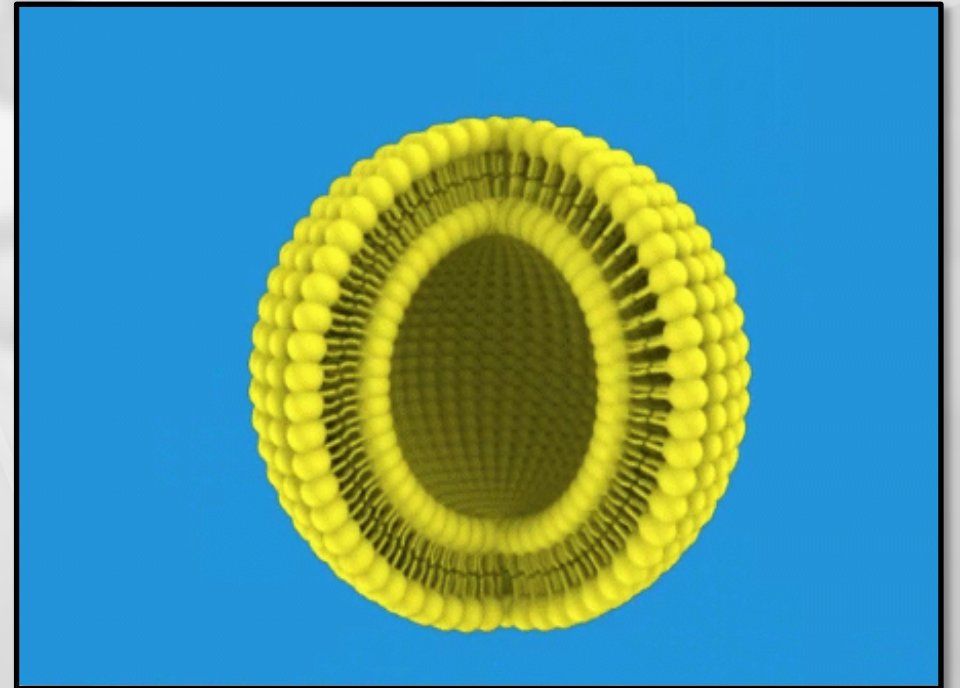
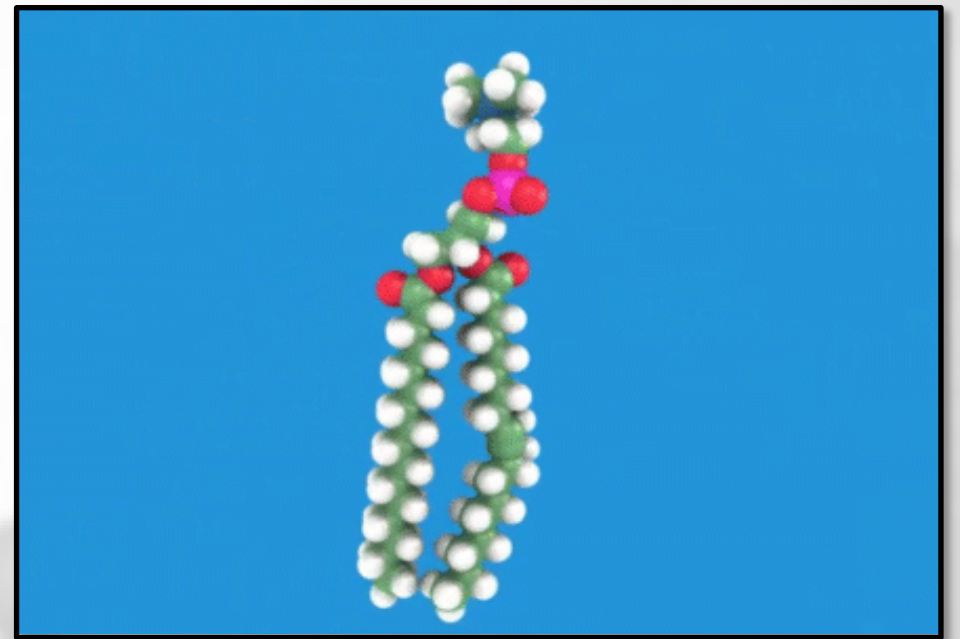
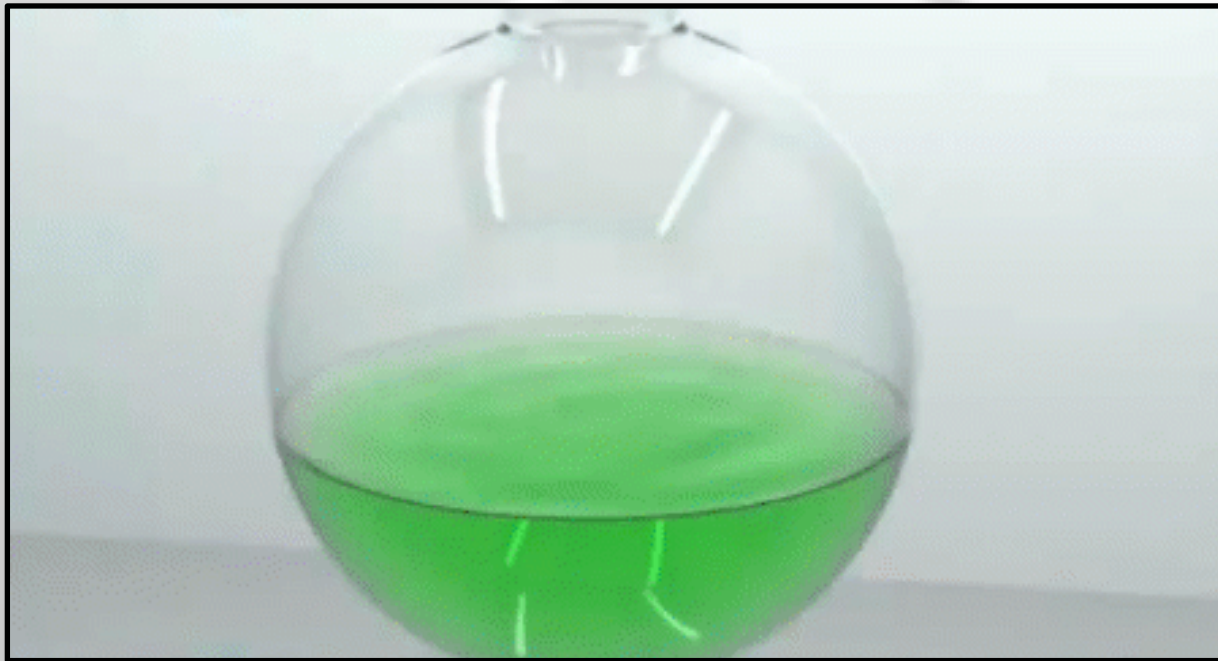
Isporuka leka kroz kožu putem lipozoma

- Lipozomi omogućuju najbolju moguću prodornost kroz kožu
- Mogućnost funkcionalizacije – ciljana isporuka
- Kontrolosano oslobađanje leka – odložena aktivnost
- Mogućnost snižavanja inicijalne koncentracija leka



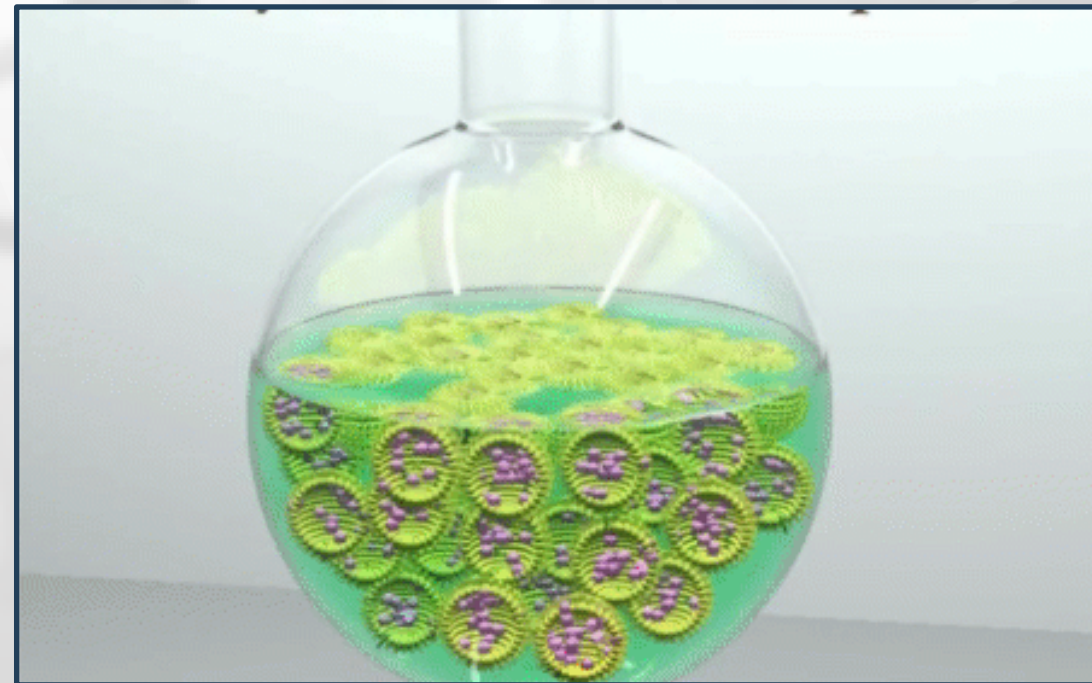
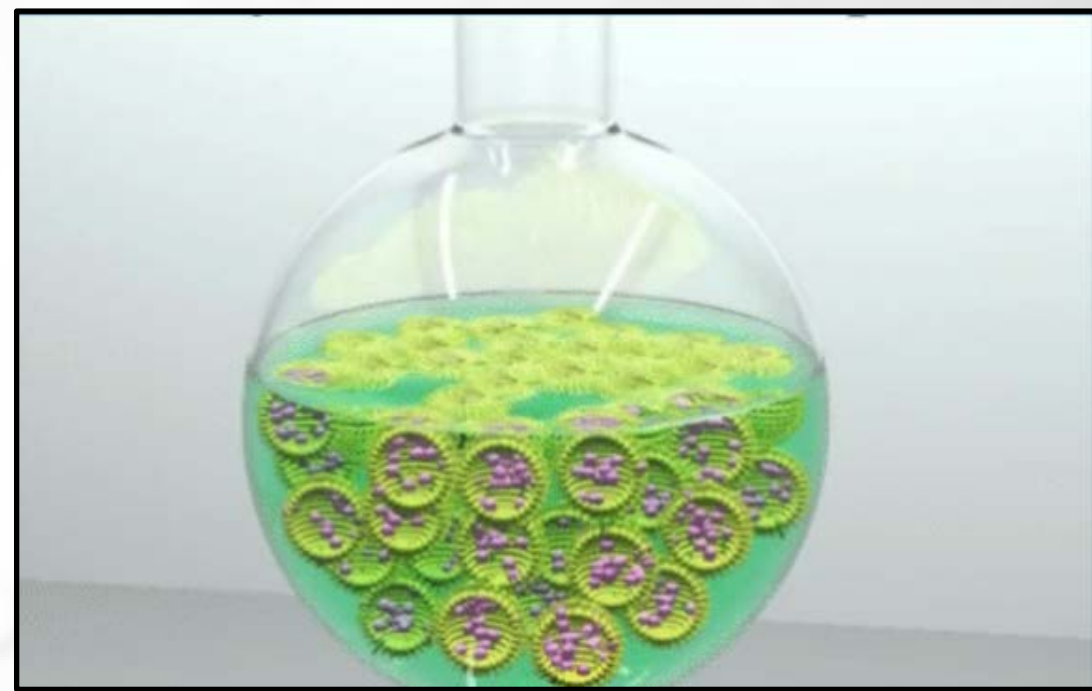
Sinteza lipozoma

- Birati sastav lipozoma u zavisnosti od namene
- Primena metode tankog filma
- Vakuumsko uparavanje – eliminacija rastvarača
- Rehidracija rastvorom hidrofilne komponente
- Moguće je simultano ubacivanje hidrofilnih i hidrofobnih aktivnih komponenti



Finalno formiranje i ispitivanje stabilnosti lipozoma

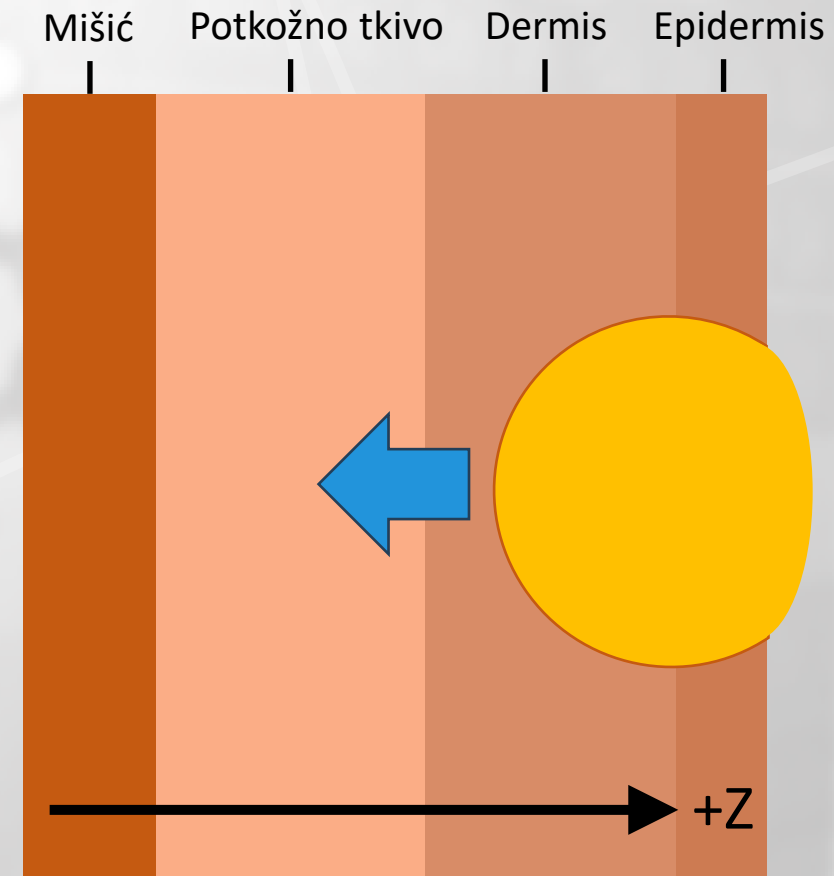
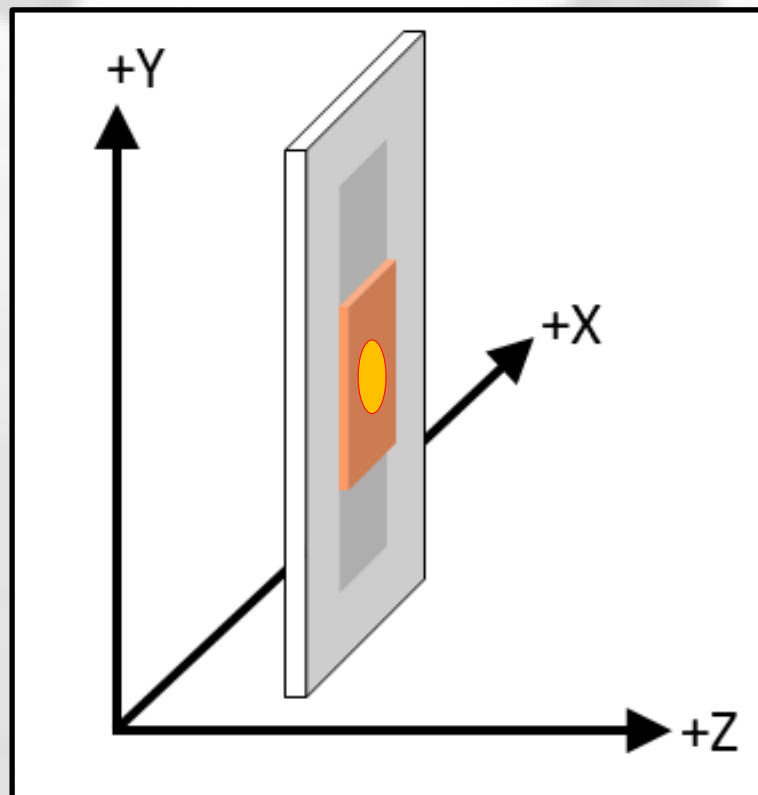
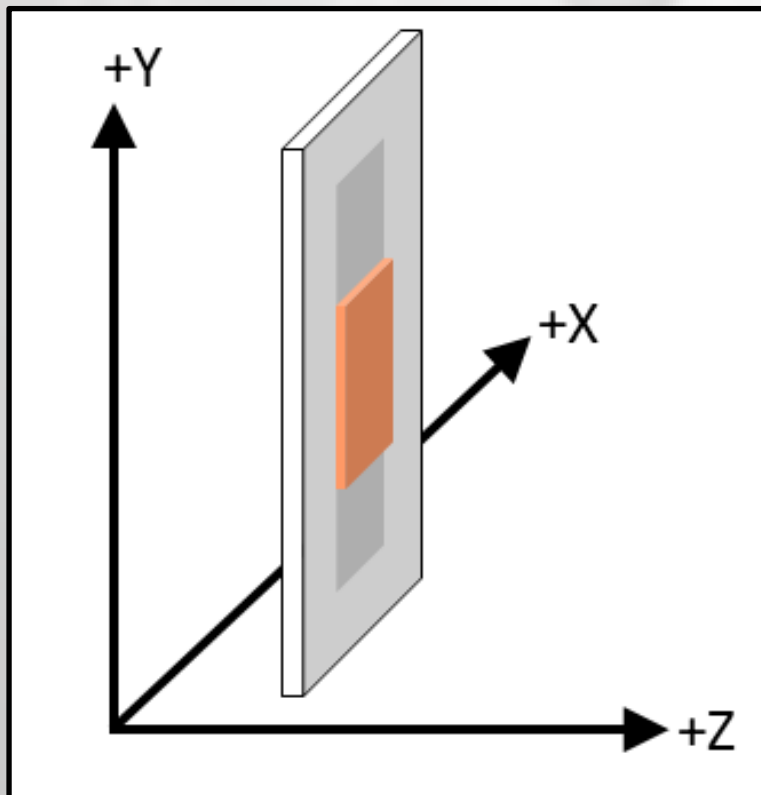
- Ekstruzija kroz membrane 50-200 nm
- Ispitivanje veličine lipozoma - DLS
- Merenje zeta-potencijala



Praćenje transporta lipozoma kroz kožu



- **Zadatak:** Ispitati mogućnost primene 2D EPRI tehnike za praćenje transporta kroz kožu.
- Naneti rastvor „obeleženih“ lipozoma („napunjenih“ aktivnim komponentima) na kožu.
- Uraditi 2D EPR imidžing kože i pratiti prodiranje lipozoma.
- Preliminarno *ex vivo*, planiraju se u nastavku *in vivo* ispitivanja.



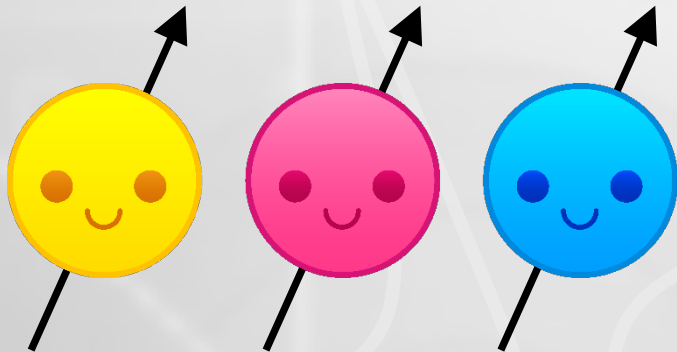
Elektronska Paramagnetna Rezonancija 101



Terminologija:

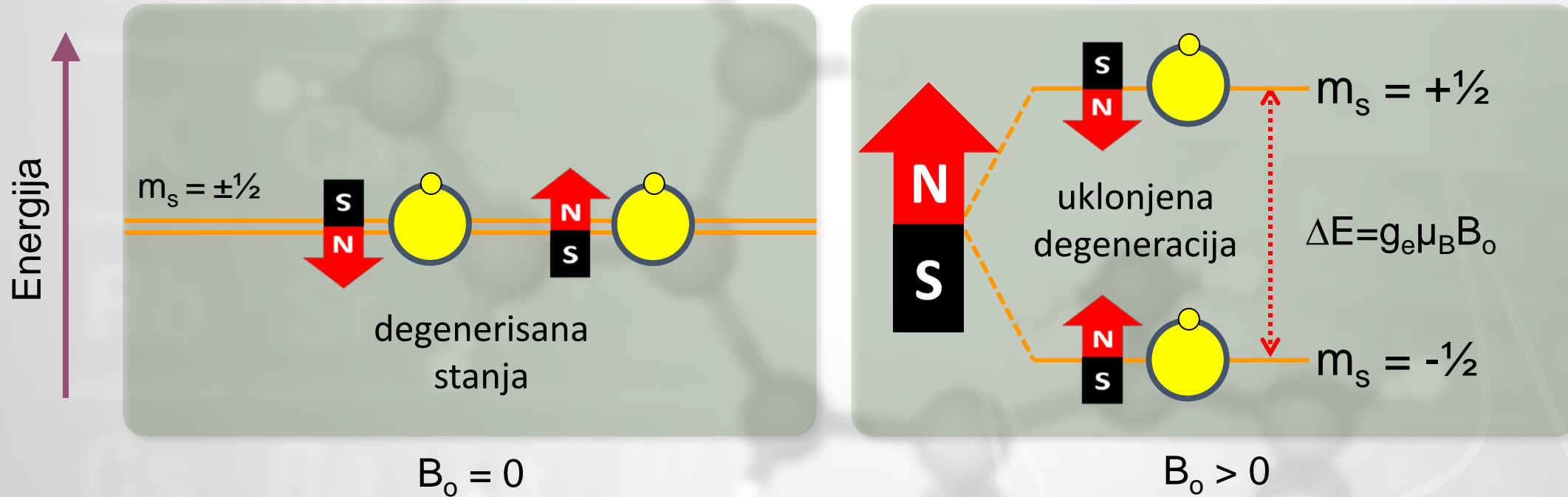
- Elektronska Paramagnetna Rezonancija (EPR)
- Elektronska Spinska Rezonancija (ESR)
- Elektronska Magnetna Rezonancija (EMR)

EPR = ESR = EMR



**EPR je rezonantna
apsorpcija
mikrotalasnog zračenja
od strane nesparenog
elektrona u prisustvu
magnetnog polja**

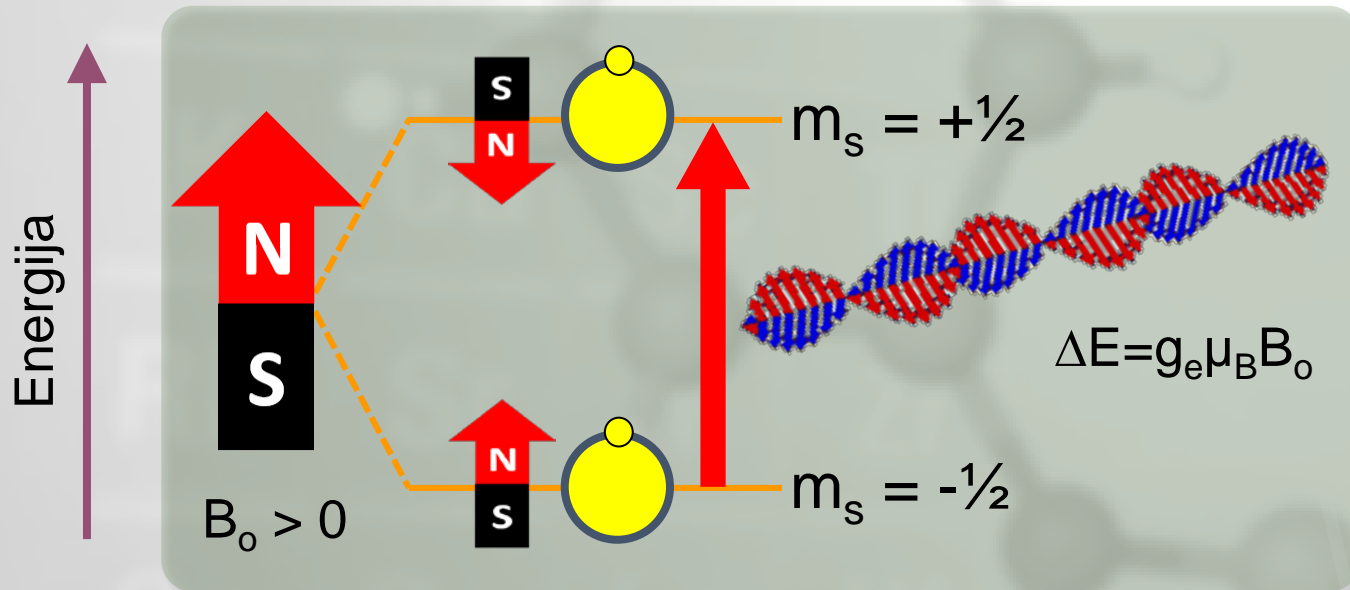
EPR – princip metode



- Svaki elektron može imati jednu od dve moguće orijentacije magnetne komponente: $m_s = +1/2$ ili $m_s = -1/2$ (spinski kvantni broj $1/2$).
- U prisustvu spoljašnjeg magnetnog polja (B_0) vektor magnetnog momenta elektrona usmerava se paralelno ($m_s = +1/2$) ili antiparalelno ($m_s = -1/2$) spoljašnjem polju B_0 .
- Zbog Zemanovog efekta, svaka od ovih orijentacija ima specifičnu energiju koja iznosi: $E = m_s g_e \mu_B B_0$

m_s : komponenta magnetnog momenta elektrona $\pm 1/2$
 g_e : g-faktor (Landeov g-faktor) i iznosi 2.0023
 μ_B : Borov magneton (9.2741×10^{-24} J/T)
 B_0 : magnetno polje (Gauss ili T)

EPR – princip metode

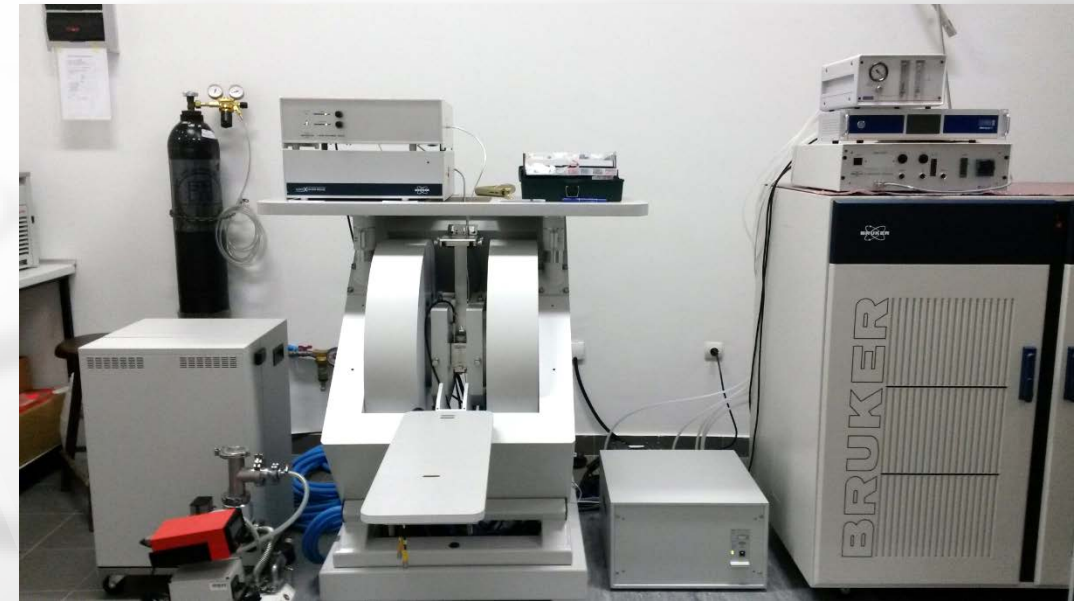


- Nespareni elektron može prelaziti sa jednog na drugi energijski nivo apsorpcijom ili emisijom fotona energije:

$$h\nu = \Delta E = g_e \mu_B B_0$$

Uslov rezonancije

h : Plankova konstanta 6.626196×10^{-34} Js
 g_e : g-faktor (Landeov g-faktor) i iznosi 2.0023
 μ_B : Borov magneton (9.2741×10^{-24} J/T)
 B_0 : magnetno polje (Gauss ili T)



- EPR spektar se može dobiti na dva načina:
 - Variranjem spoljašnjeg magnetnog polja B_0 uz konstantnu frekvenciju EMT (CW mašine).
 - Slanjem paketa EMT različitih frekvencija uz konstantno magnetno polje B_0 (pulsne mašine). Za ovo je potrebna veoma brza elektronika.

Da li se EPR može koristiti u biološkim sistemima "*in vivo*" ili "*ex vivo*" ?

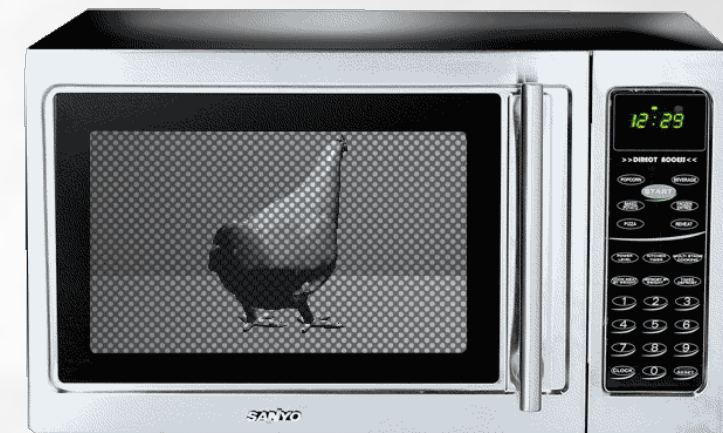
- Da, ali postoji jedan "mali" problem.
- Biološki uzorci su "vodeni" i zbog toga podležu nerezonantnoj apsorpciji mikrotalasne energije, zato je dubina prodiranja mikrotalasa u uzorak mala.
- Ako povećamo mikrotalasnu snagu, dubina prodiranja se povećava ali ...

Problem dubine prodiranja se može rešiti i smanjenjem frekvencije mikrotalasa

Frekvencija	<u>~300 MHz</u>	<u>~750 MHz</u>	<u>1-2 GHz</u>	<u>~3 GHz</u>	<u>9-10 GHz</u>
Dubina prodiranja	> 10 cm	6-8 cm	1-1.5 cm	1-3 mm	1 mm
Biološki uzorak	Ljudi, pacov	Pacov, miš	Miš, srce pacova	Mišiji rep, koža	Uzorci "in vitro" (~100 µl)

Smanjenje frekvencije smanjuje vrednost B_0 a time i osetljivost

- EM zračenje slabi zbog dielektričnih gubitaka (B prolazi ali ne E).

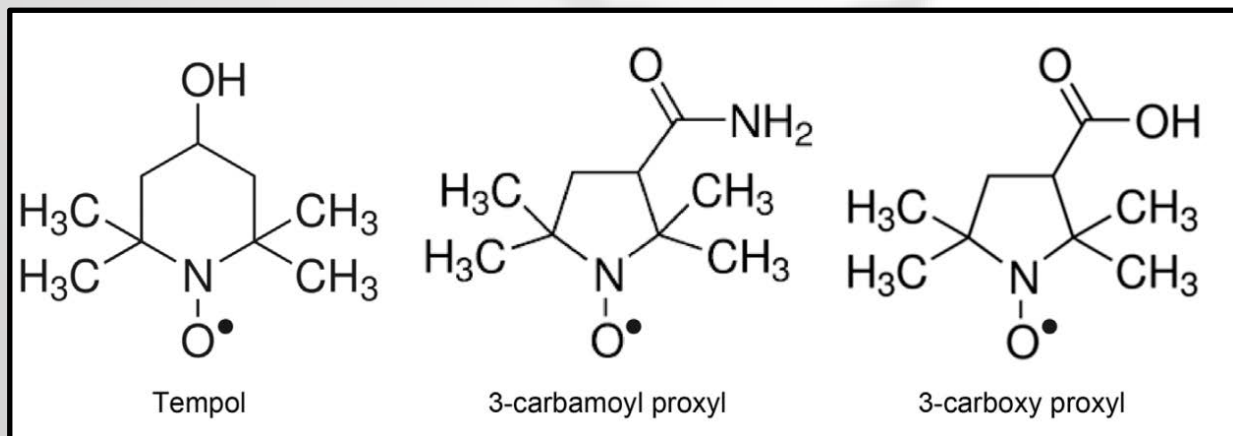


... tada dobijamo „mikrotalasnu“



Spinske probe i spinski obeleživači

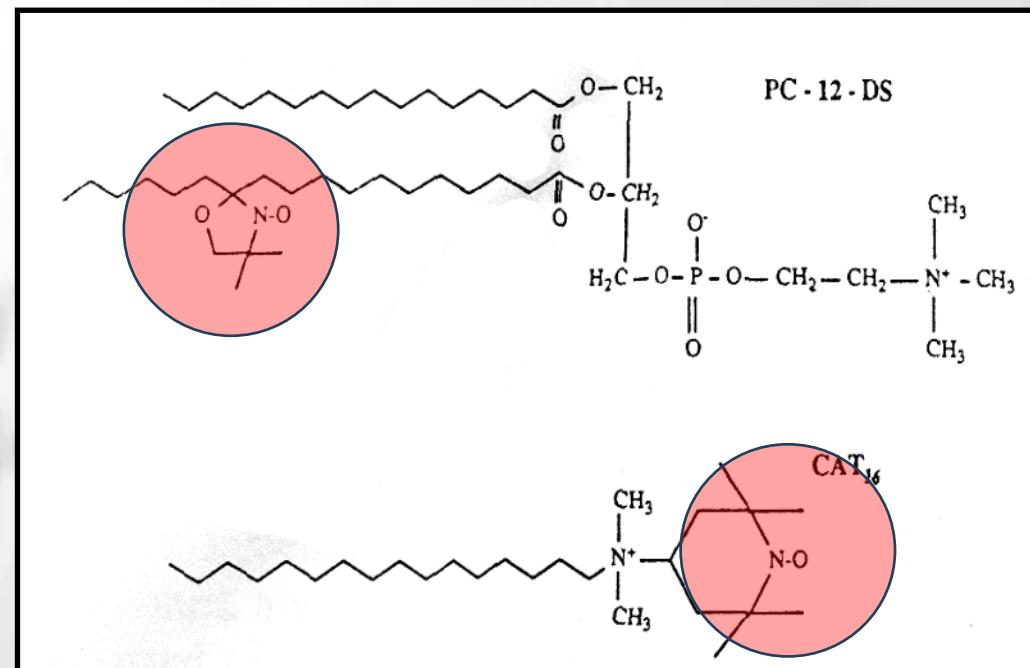
- **Spinske probe** – su stabilni (dugoživeći) slobodni radikali (nitroksidi) koji se ubacuju u sistem da bi se ispitala neka osobina ispitivanog sistema.
- Reaktivne grupe su sterno zaklonjene.



Prolazi kroz
ć.membr.
kratkoživeća

Prolazi kroz
ć.membr.
dugoživeća

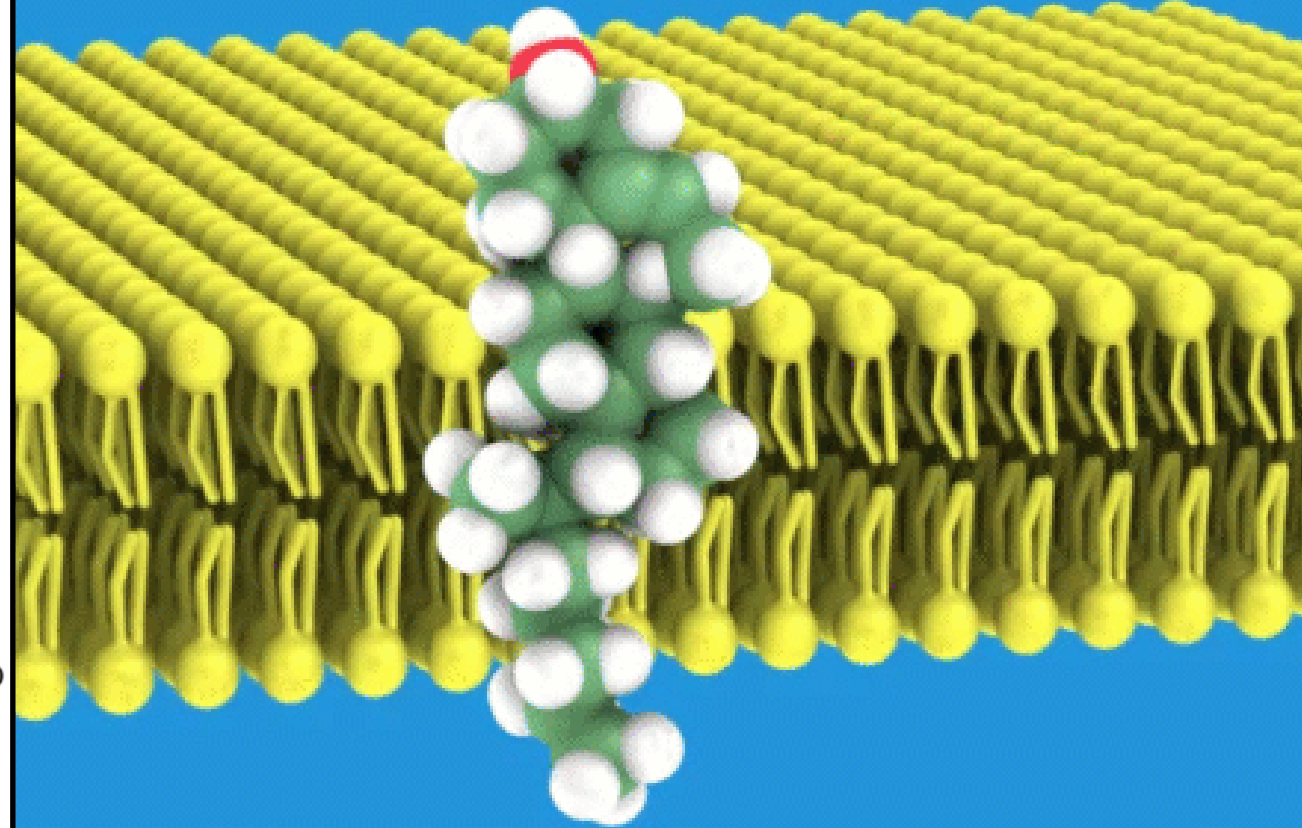
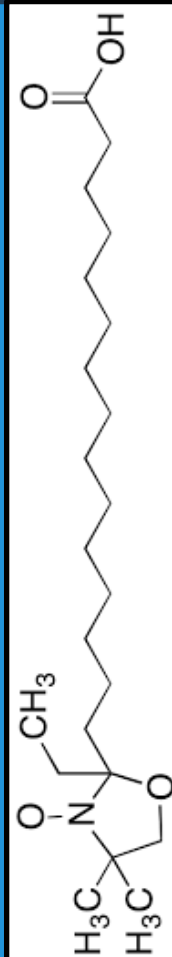
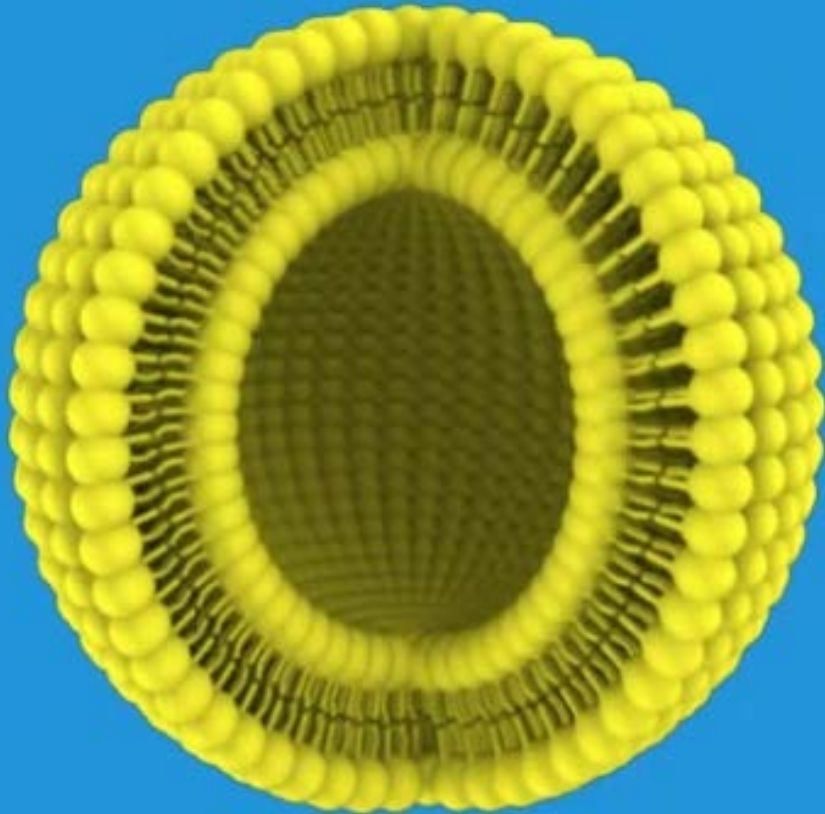
Ne prolazi kroz
ć.membr.
dugoživeća



- **Spinski obeleživači** (spin labels) – nitroksidi vezani za druge molekule (npr. masne kiseline).
- Koriste se za praćenje osobina ćelijske membrane (ili u našem slučaju položaja lipozoma).

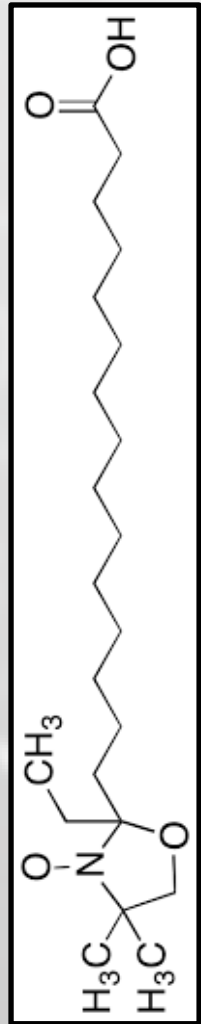
Spinsko obeležavanje lipozoma

- Zato je najpre potrebno **obeležiti lipozom spinskim obeleživačem**.
- Liposome obeležavamo nakon kompletirane sinteze i karakterizacije.
- Spinski obeleživači imaju sličan sastav kao membrana, pa je integracija energetski povoljan proces.



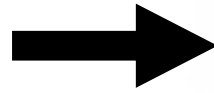
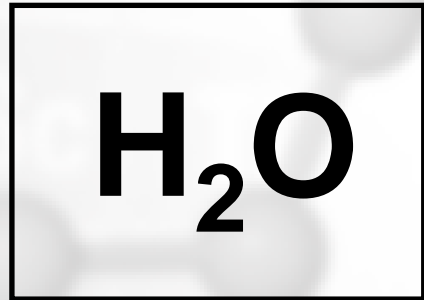
16-doksilstearinska kiselina (16-DS)

Šta se dešava sa EPR spektrima spinskih obeleživača kada se ugrade u membranu ???



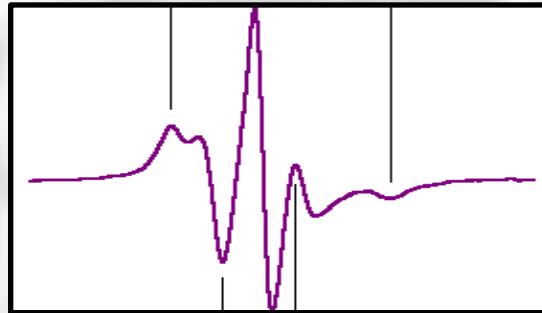
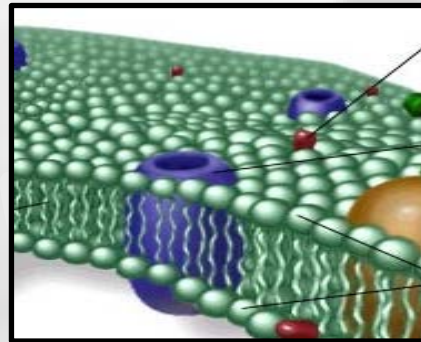
16-DS

+

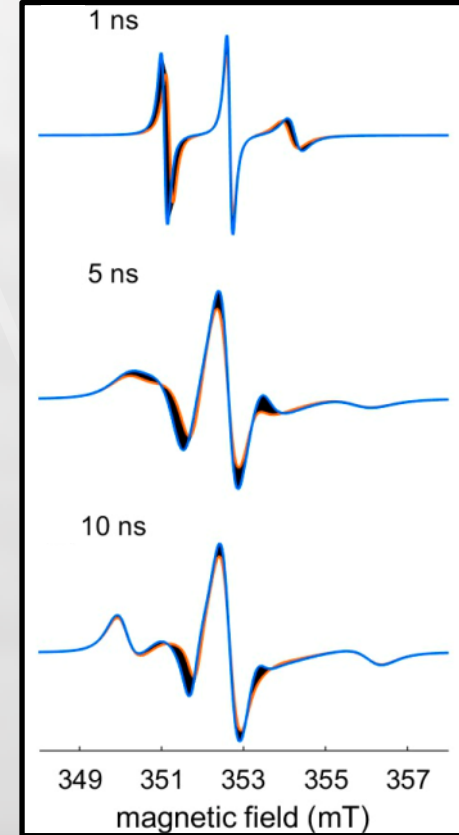


U vodenom rastvoru

+



Integrisan u membranu

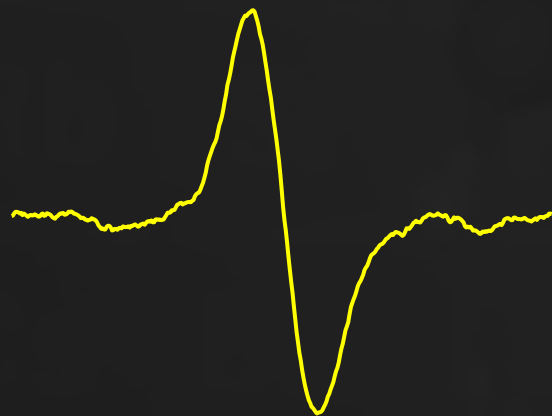


- Ukupan spektar 16-DS ugradjene u membranu potpuno odudara od onog iz rastvora.
- Do toga dolazi zbog **anizotropije**.
- Ovo nam omogućava da ustanovimo **da li je takođe očuvan integritet lipozoma**.
- Na sličan način lako možemo obeležavati i proteine (Mojović & Pavicevic, Eur Biophys J. 773–787, 46, 2017).

EPR imidžing – princip dobijanja slike

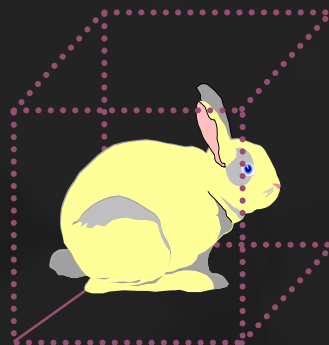


Ali, za naša ispitivanja spektroskopija nije dovoljna ...



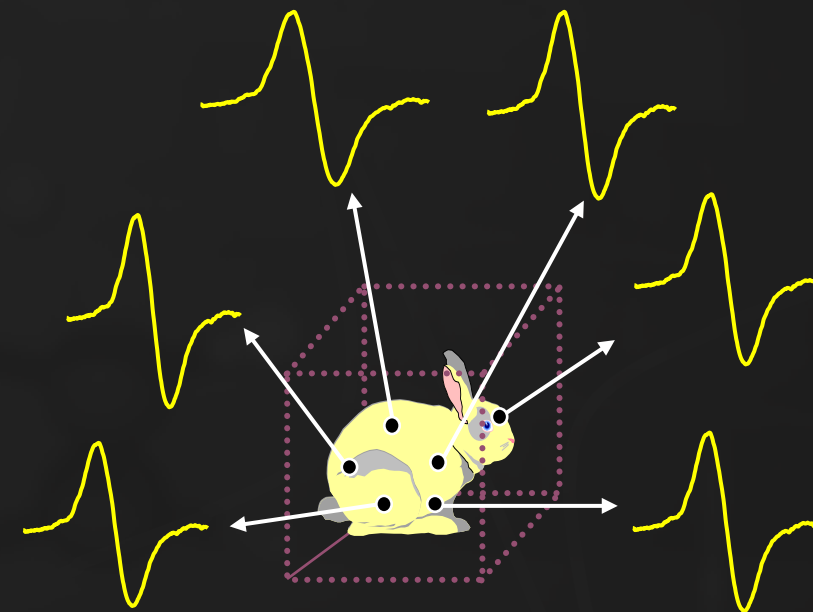
EPR spektroskopija

Nema prostorne raspodele



EPR prostorni imidžing
1D, 2D, 3D

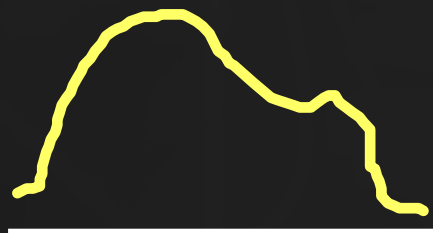
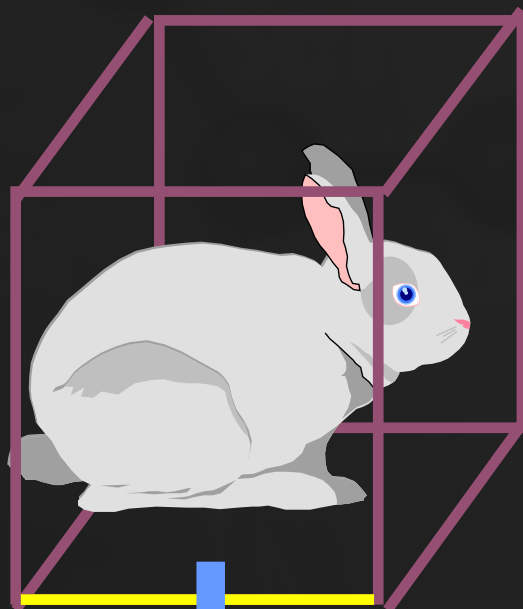
Postoji prostorna raspodela
Spinske gustine



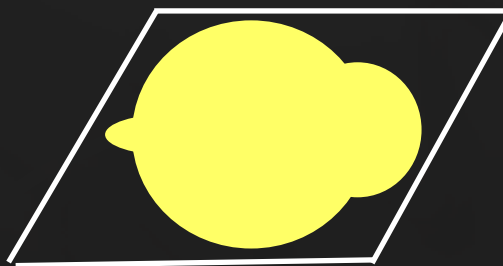
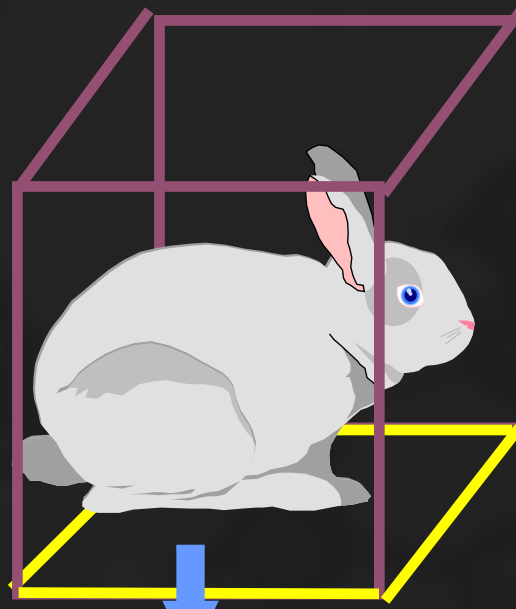
Spektralno-prostorni
Imidžing (2D, 3D)

Prostorna raspodela +
Izgled spektra

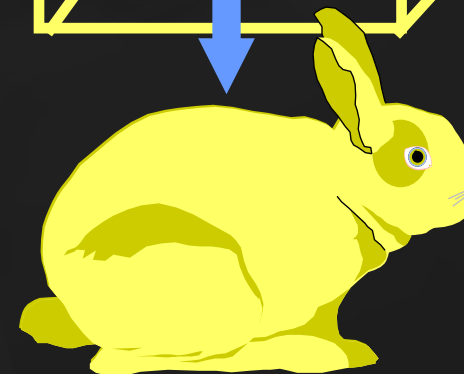
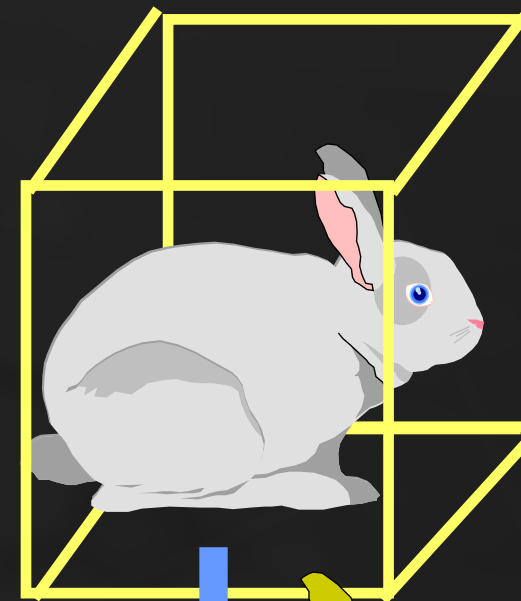
EPR imidžing – princip dobijanja slike



1D PROSTORNI



2D PROSTORNI

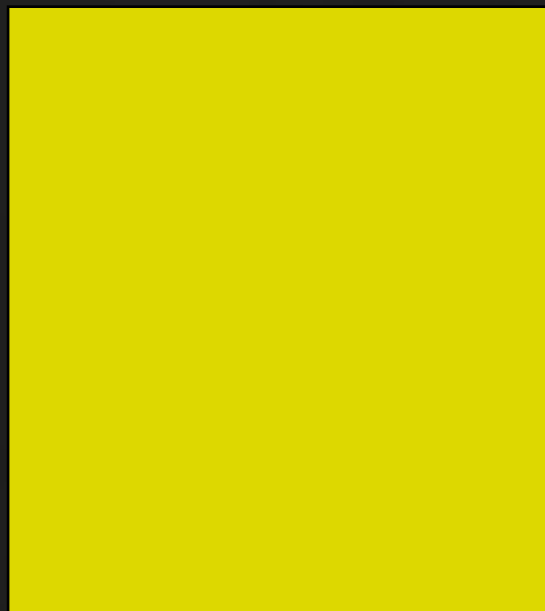


3D PROSTORNI

EPR imidžing – princip dobijanja slike

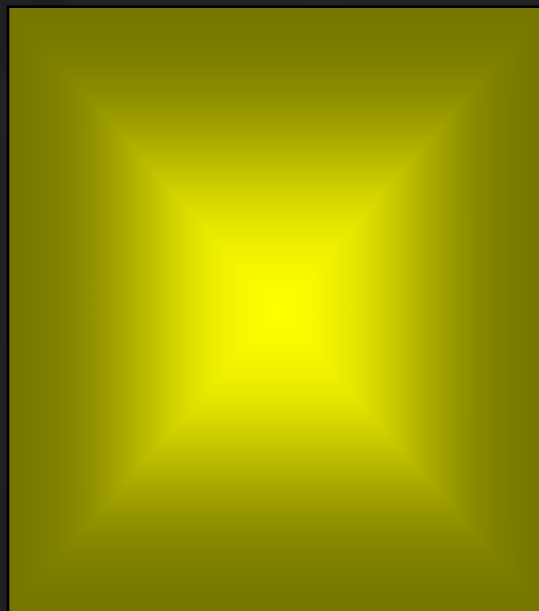


Homogeno
(Spektroskopija)



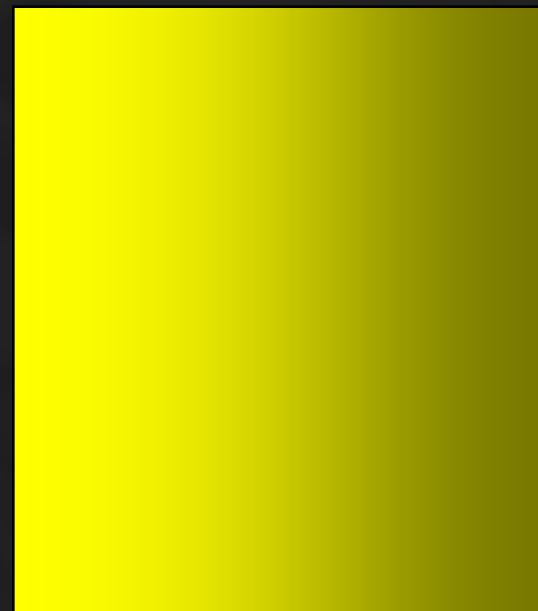
Rastojanje --->

Ne-homogeno
(Neupotrebljivo)



Rastojanje --->

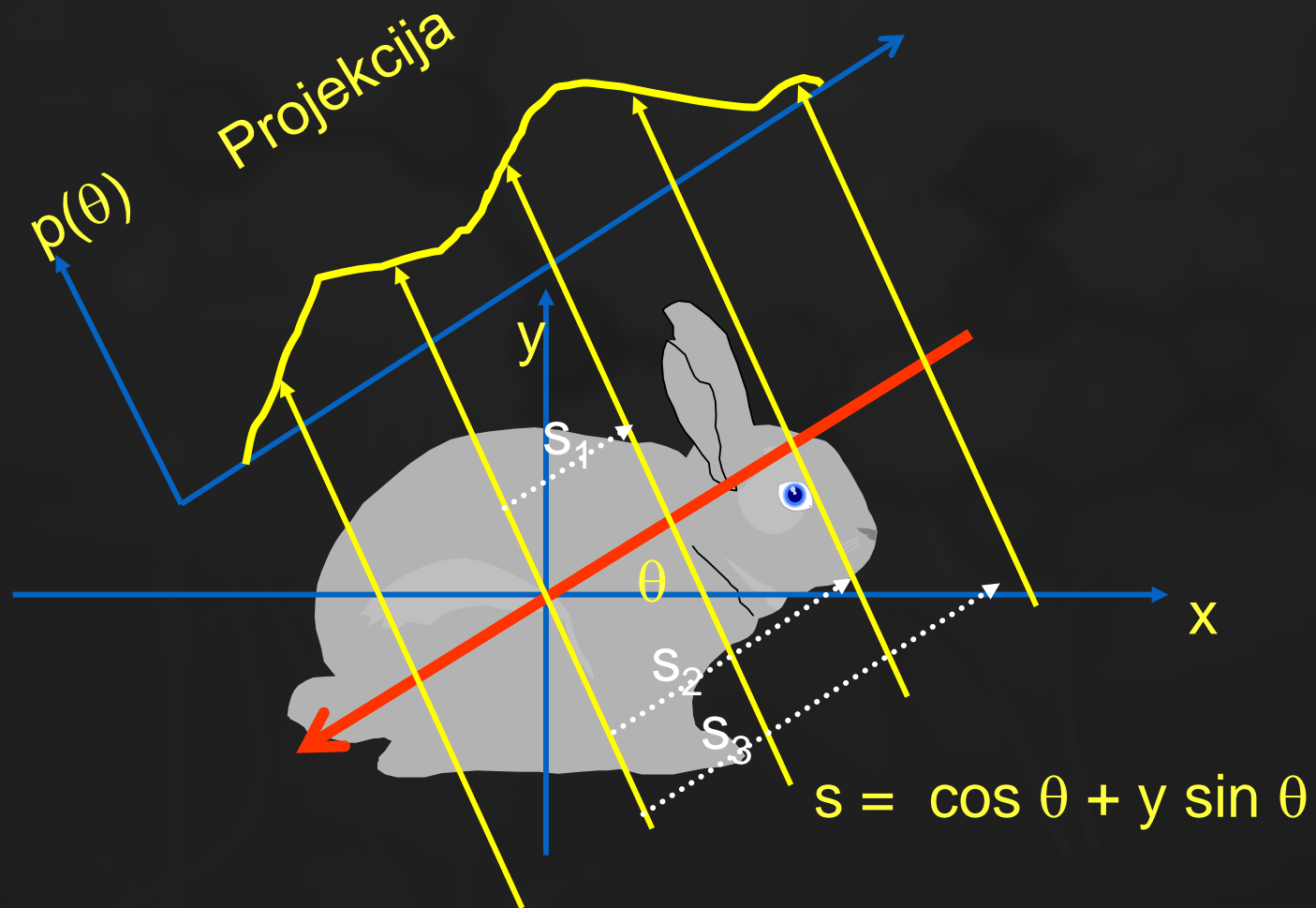
Gradijent
(Imidžing)



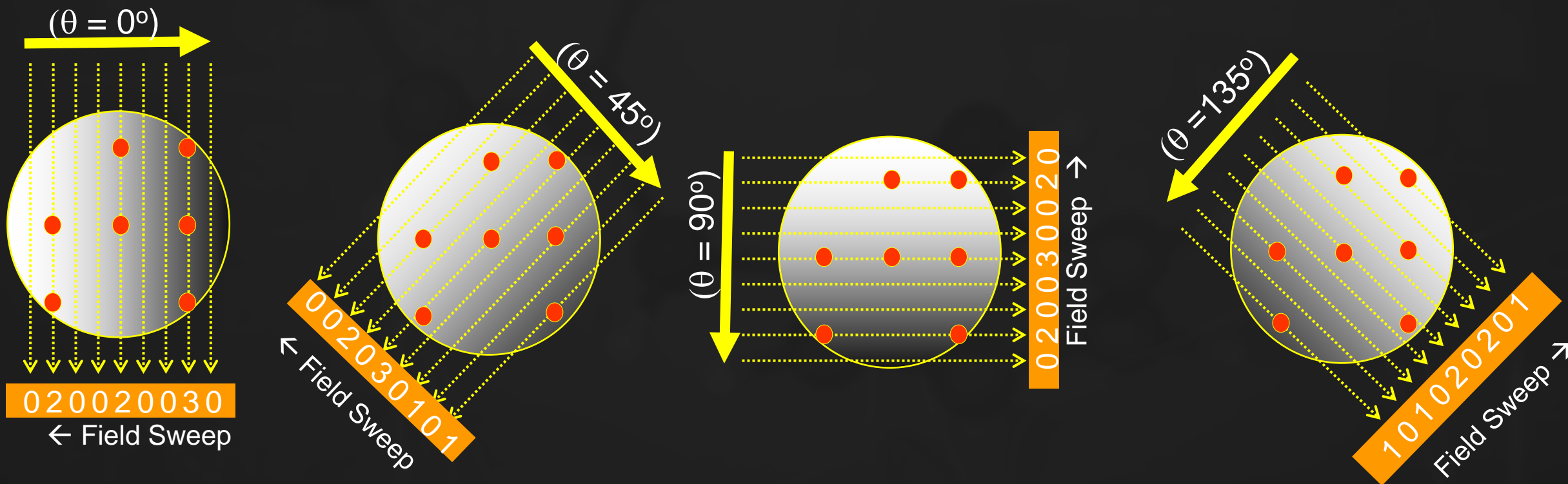
Rastojanje --->

<----- Magnetno polje

EPR imidžing – princip dobijanja slike



EPR imidžing – princip dobijanja slike



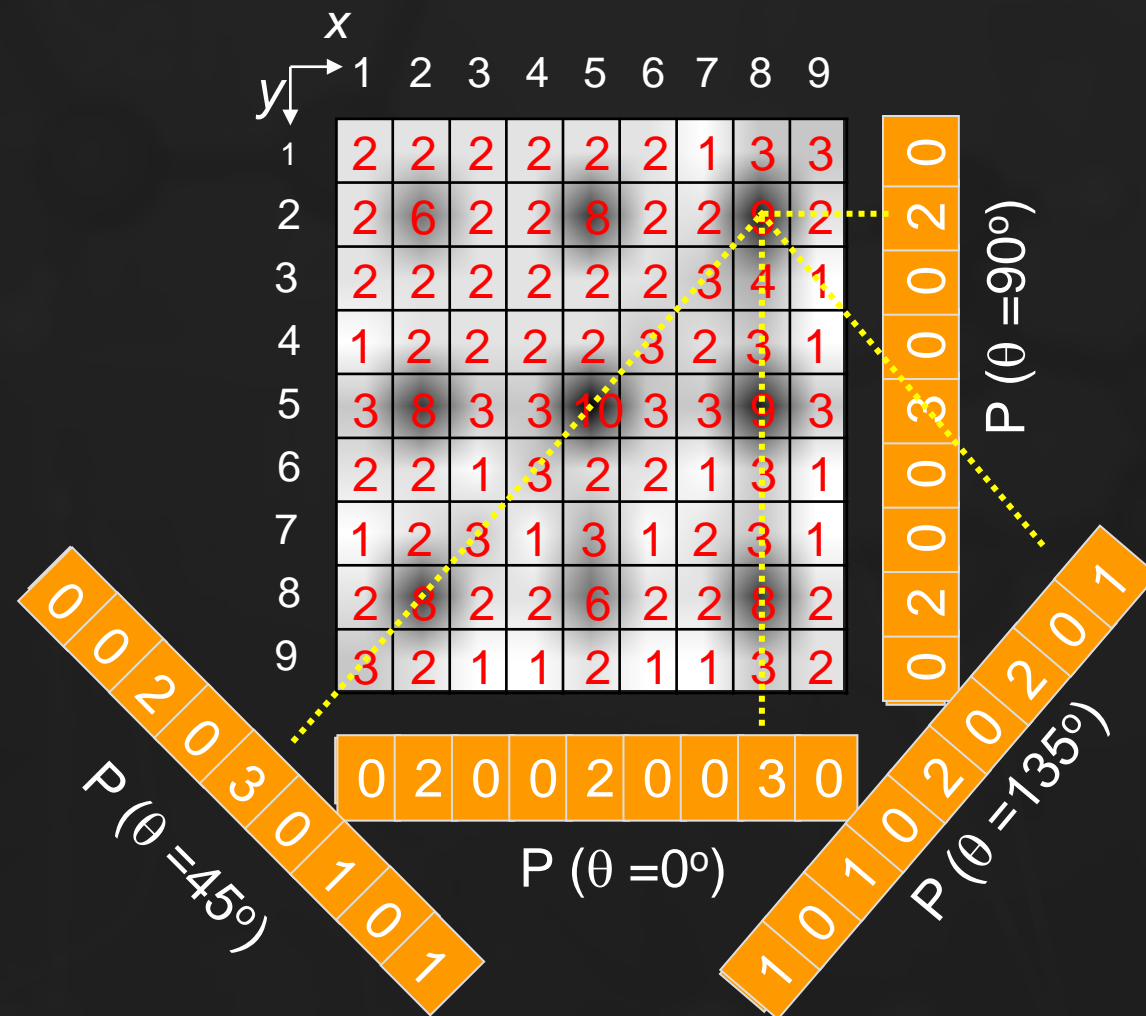
● Spinska
gustina

..... Smer

———— Gradijent polja

Projekcija

EPR imidžing – princip dobijanja slike



Slično kao MRI ...

EPRI v.s. MRI

- Postoje bitne razlike u osobinama jezgara i elektrona (žiromagnetni odnosi, hiperfine konstante cepanja, relaksaciona vremena).
- Zbog toga se MRI uvek izvodi u pulsnom režimu (RF-puls + frekventni, fazni i "slice" gradijenti magnetnog polja, uz razne sekvence tipa spin-eho., 2D FT i rekonstrukcije slike iz vokseli).
- EPRI se često izvodi u CW režimu uz rotirajuće magnetne gradijente.
- MRI ima do 10^6 puta veću koncentraciju spinova u sistemu, kao i do 10^6 duže relaksaciono vreme za te iste spinove.
- Prosečna širina EPR pikova je znatno veća u odnosu na raspoloživ opseg magnetnog polja u odnosu na NMR signal H koji se posmatra u MRI.
- Pulsni EPRI zato zahteva vrlo preciznu i naprednu elektroniku uz brze računare koji će zadavati sekvence i dešifrovati dobijene rezultate.

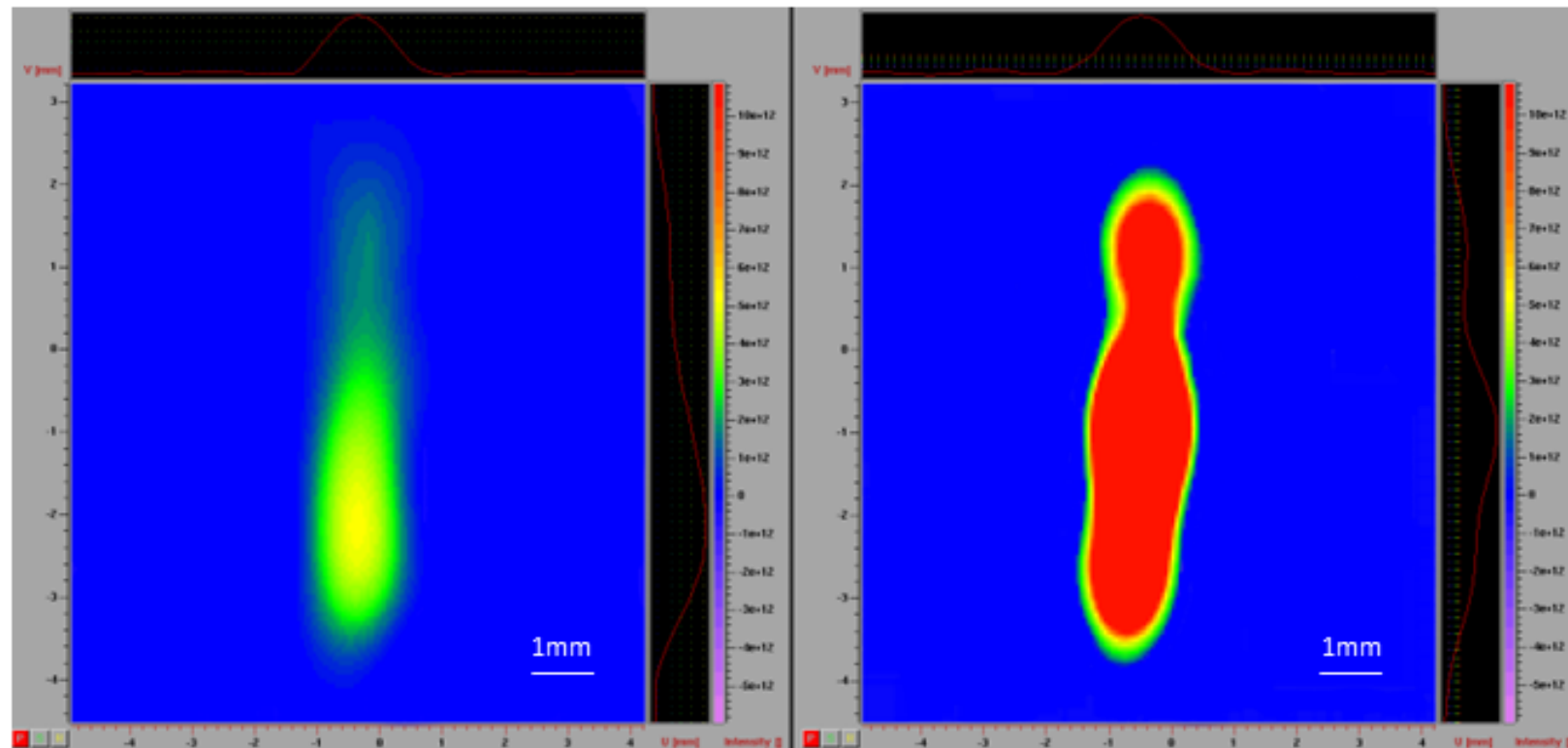
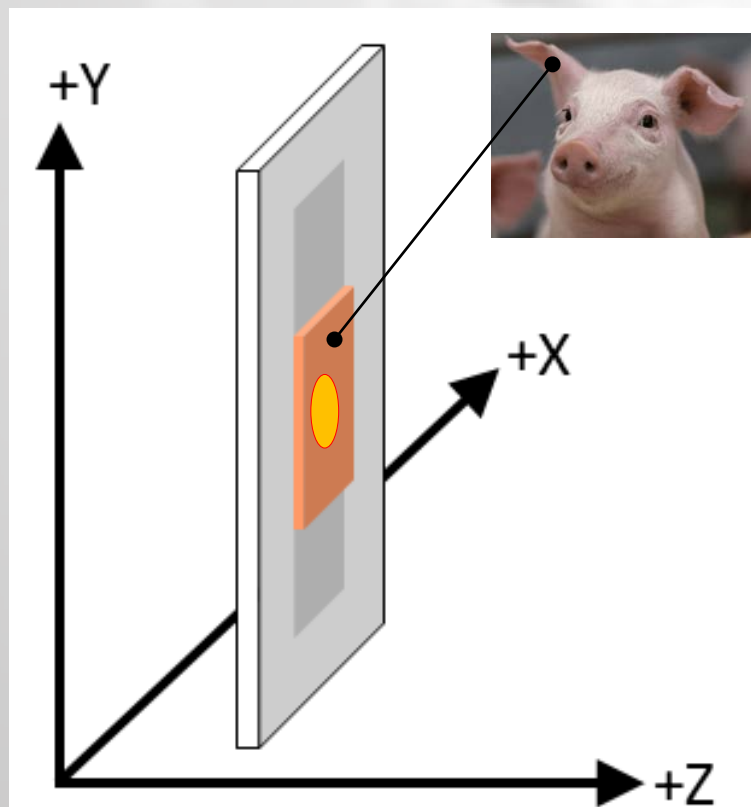
	NMR imaging	EPR imaging
T_1	hundreds of ms to seconds	5.9-6.2 μ s trityls; <1 μ s nitroxyls
T_2	tens of ms to seconds	4.3-5.3 μ s trityls; <0.5 μ s nitroxyls
echo time	tens of ms	a few μ s

Ispitivanje transporta lipozoma kroz kožu



30% BSA hidrogel
obeležen 16-DS

Lecitin/Chol lipozomi
obeleženi 16-DS



- Poredi se efikasnost transporta kroz kožu (lipozoma u odnosu na albuminski hidrogel).

1. Uzorak nanet na svinjsko uvo.
2. Inkubacija 15 min.
3. Ispiranje uzorka vodom.

- Rezolucija snimanja 0.01mm
- Jačina Z-gradijenta 40 G/cm
- Kolor skala srazmerna je koncentraciji

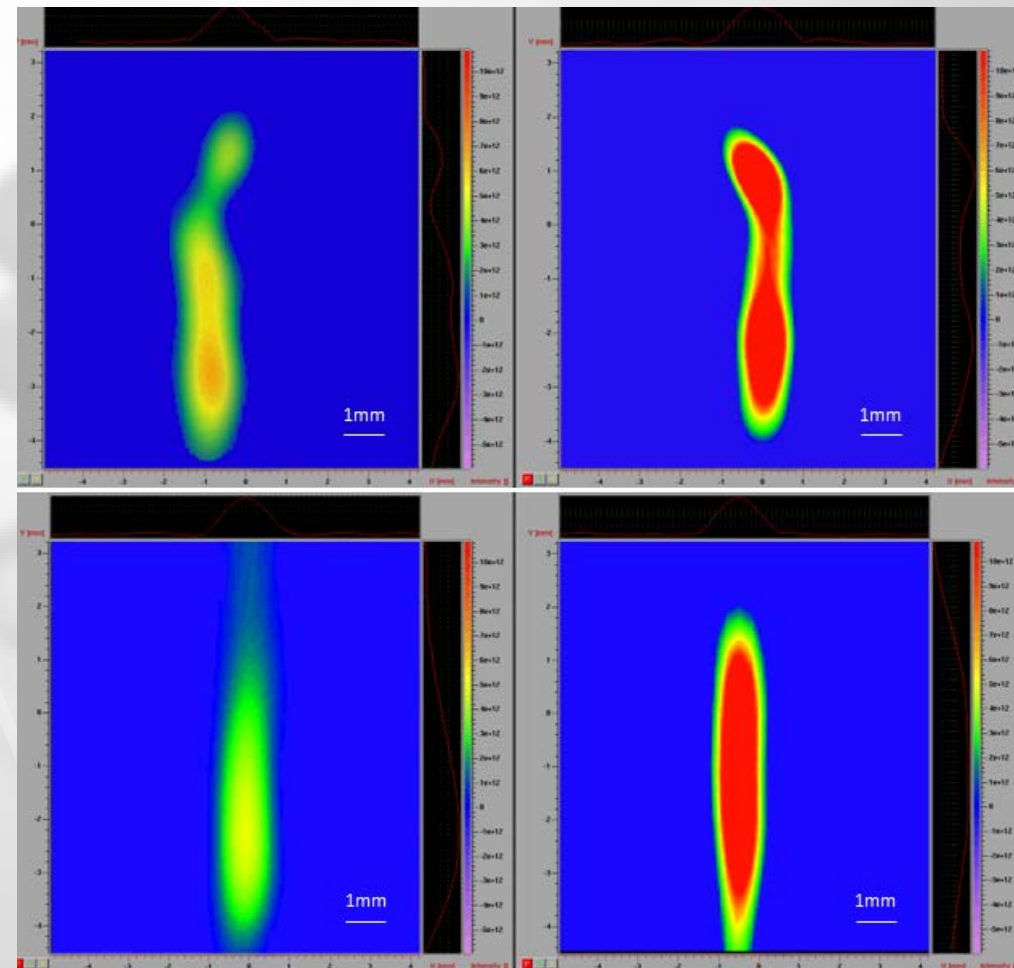
Ispitivanje transporta lipozoma kroz kožu



- Ponovljena merenja pokazuju isti trend.
- Pokazano je da lipozomi efikasno prodiru u kožu.
- Lipozomi bolje prodiru u kožu od hidrogela.

Zaključak:

- 2D EPRI spektroskopija je efikasna metoda za ispitivanje prodiranja nosača leka kroz kožu.



Hidrogel

Lipozomi



Hvala na pažnji!

www.bioscope.ffh.bg.ac.rs