Utjecaj žučnih soli na permeabilnost liposoma i mehanizam oslobađanja kalceina

Cvetković, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:236391

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Ivan Cvetković

Utjecaj žučnih soli na permeabilnost liposoma i mehanizam oslobađanja kalceina

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Oblikovanje lijekova 2, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u suradnji sa Zavodom za farmaceutsku tehnologiju i biofarmaciju, Albert-Ludwigovog sveučilišta u Freiburgu, (Freiburg, Njemačka), pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Željke Vanić, Stefana Brauna, mag. pharm. i prof. dr. sc. Rolfa Schuberta.

Zahvala:

Srdačno zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Željki Vanić na potpori, razumijevanju i stručnom vodstvu pri izradi mog diplomskog rada.

Posebna zahvala prof. dr. Rolfu Schubertu i mom neposrednom mentoru u Freiburgu, Stefanu Braunu, mag. pharm. na uloženom trudu, strpljenju i stručnom vodstvu bez kojeg bi izrada ovog diplomskog rada bila nemoguća.

Veliko hvala i djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju i biofarmaciju, Sveučilišta u Freiburgu, koji su mi svojim savjetima pomogli u istraživanju.

Posebno se želim zahvaliti svojim roditeljima na potpori i razumijevanju tokom studiranja.

Hvala i svim mojim prijateljima koji su mi svojom potporom i društvom uljepšali studiranje na ovom fakultetu.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. LIPOSOMI 1
1.1.1. Struktura i svojstva liposoma 1
1.1.2. Klasifikacija liposoma 2
1.1.3. Metode pripreme liposoma 3
1.1.3.1. Metoda hidratacije suhog fosfolipidnog sloja, tzv. film metoda 4
1.1.3.2. Primjena ciklusa smrzavanja-odmrzavanja (*Freeze-thaw cycles*) 4
1.1.3.3. Metoda ekstruzije 5
1.1.4. Karakterizacija liposoma fotonskom korelacijskom spektroskopijom 6
1.1.5. Odjeljivanje liposoma s uklopljenom djelatnom tvari od neuklopljene frakcije gel kromatografijom 7
1.1.6. Permeabilnost fosfolipidnog dvosloja liposoma i oslobađanje uklopljenog sadržaja iz liposoma 7
1.2. FLUORESCENCIJA I MJERENJE VREMENA ŽIVOTA FLUORESCENCIJE (*FLUORESCENCE LIFE-TIME ASSAY*) 8
1.3. ŽUČNE SOLI 12
2. OBRAZLOŽENJE TEME 14
3. MATERIJALI I METODE 15
3.1. MATERIJALI 15
3.2. METODE 16
3.2.1. Priprema Tris pufera 16
3.2.2. Priprema otopine kalceina 16
3.2.3. Priprema kolone za gel kromatografiju 16
3.2.4. Priprema liposoma 17
3.2.5. Određivanje srednjeg promjera i indeksa polidisperznosti liposoma 17
3.2.6. Odjeljivanje liposoma s uklopljenim kalceinom gel kromatografijom 18
3.2.7. Određivanje koncentracije fosfolipida u eluiranoj frakciji liposoma Bartlett-ovom metodom 19
3.2.8. Priprema standardnih otopina žučnih soli 21
3.2.8.1. Priprema standardne otopine natrijeva kolata 21
3.2.8.2. Priprema standardne otopine natrijeva deoksikolata 21
3.2.8.3. Priprema standardne otopine natrijeva taurokolata 21
3.2.9. Mjerenje vremena života fluorescencije 21

3.2.9.1. Ispitivanje utjecaja natrijevog kolata na permeabilnost liposoma s kalceinom 22
3.2.9.2. Ispitivanje utjecaja natrijevog deoksikolata na permeabilnost liposoma s kalceinom 23
3.2.9.3. Ispitivanje utjecaja natrijevog taurokolata na permeabilnost liposoma s kalceinom 24
4. REZULTATI I RASPRAVA 26
4.1. Srednji promjer liposoma i indeks polidisperznosti 26
4.2. Određivanje vremena života fluorescencije kalceina i udjela oslobođenog kalceina iz liposoma (*efflux*) 26
5. ZAKLJUČCI 47
6. LITERATURA 48
7. SAŽETAK/SUMMARY 50

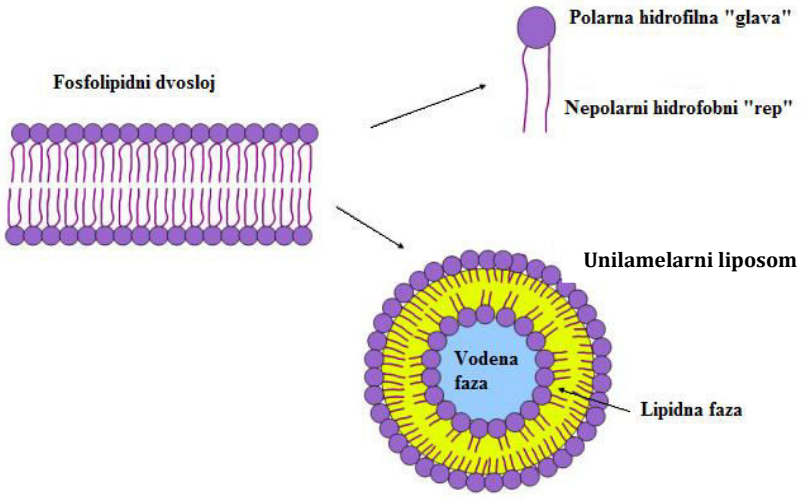
1. UVOD

1.1. LIPOSOMI

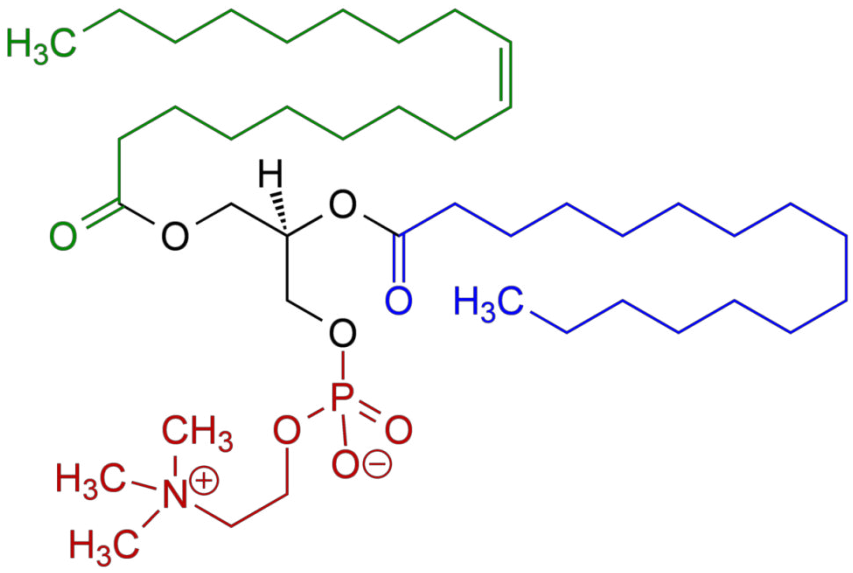
1.1.1. Struktura i svojstva liposoma

Liposomi su sferične fosfolipidne vezikule promjera od oko 20-ak nm do nekoliko desetaka μm. Sastoje se od jednog ili više koncentrično položenih fosfolipidnih dvoslojeva koje odvajaju unutarnju (zatvorenu) vodenu fazu od vanjske vodene faze. Fosfolipidi su u dvosloju orijentirani tako da su lipofilni dijelovi molekula orjentirani jedan prema drugome, dok su hidrofilni dijelovi okrenuti prema vanjskoj i unutarnjoj vodenoj fazi (Slika 1) (Vanić, 2012a).

Struktura liposomskog dvosloja veoma je nalik biološkim membranama. Do nastanka biomembranama-sličnih dvosloja može doći samo ako amfipatske molekule zadovoljavaju određene strukturne zahtjeve, pri čemu je posebno bitna geometrija amfipatske molekule. Molekularna struktura fosfolipida može se podijeliti na dva osnovna dijela: hidrofilnu „glavu“ i hidrofobne „repove“ (Slika 1). Hidrofilnu glavu čini diester fosforne kiseline, s jedne strane vezan na hidroksilnu skupnu glicerola, a s druge strane na kolin, etanolamin, glicerol, inozitol ili serin. Lipofilni „rep“ čine alkilni lanci masnih kiselina s 12-24 C-atoma, vezani na preostale dvije hidroksilne skupine glicerola. Najčešće korišteni fosfolipidi su fosfatidilkolin (PC) (Slika 2), fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilserin (PS) i fosfatidilglicerol (PG) (Lasic, 1993).



Slika1. Struktura liposoma i fosfolipidnog dvosloja (prilagođeno prema Belhocine i sur. 2011)



Slika 2. Fosfatidilkolin (PC) (https://en.wikipedia.org/wiki/Phosphatidylcholine)

Zbog amfipatskog karaktera fosfolipida i njihove organizacije u zatvorene strukture, liposomi mogu uklopiti različite molekule/djelatne tvari. Hidrofobne molekule će se ugraditi u dvoslojnu lipidnu membranu, hidrofilne tvari u unutarnju vodenu fazu, a amfipatske molekule između ovih dviju faza. Takva svojstva omogućila su široku primjenu liposoma kao nosača lijekova za *in vivo* primjenu te modelnih bioloških membrana (Grabielle-Madelmont i sur., 2003).

Najčešći izvori fosfatidilkolina su lecitini dobiveni iz soje (eng. *soy phosphatidylcholine*, SPC) ili žumanjaka jaja (eng. *egg phosphatidylcholine*, EPC). Pritom su lecitini, tj. fosfatidilkolini iz soje pristupačniji po cijeni, a sastavom su bogatiji nezasićenim masnim kiselinama. Često se koriste za izradu liposoma namijenjenih topikalnoj primjeni. Fosfatidilkolin je zwitterion u neutralnom pH području (Vanić, 2012a).

1.1.2. Klasifikacija liposoma

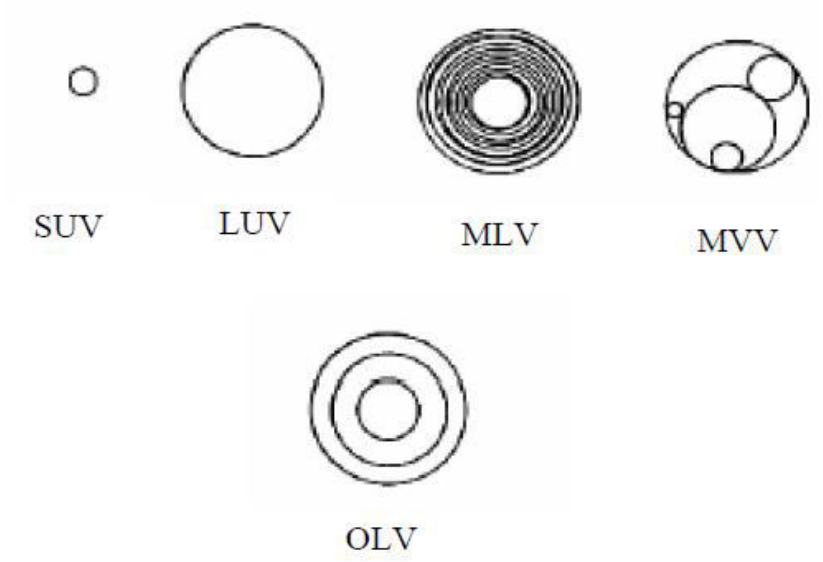
Uobičajena klasifikacija liposoma temelji se na njihovoj veličini i broju fosfolipidnih dvoslojeva (Slika 3).

Mali unilamelarni liposomi (eng. *small unilamellar vesicles*, SUV) imaju promjer do 100 nm te jedan dvosloj. Prednost SUV-a je u sporoj eliminaciji iz sistemske cirkulacije, što je rezultat njihovog malog promjera.

Veliki unilamelarni liposomi (eng. *large unilamellar vesicles*, LUV) imaju promjer veći od 100 nm te također samo jedan dvosloj. Stabilniji su od SUV-a jer su njihove membrane manje podložne savijanju.

Veliki oligo- i multi-lamelarni liposomi (eng. *oligolamellar/multilamellar vesicles*, OLV/MLV) imaju promjer veći od 500 nm. Sastoje se nekoliko (OLV) ili velikog broja (MLV) koncentrično položenih dvoslojeva.

Multivezikularni liposomi (eng. *multivesicular vesicles*, MVV) imaju promjer veći od 1000 nm, a karakteristični su po tome što se unutar jedne velike vezikule nalazi jedna ili više zanačajno manjih vezikula (Kalie, 2006).



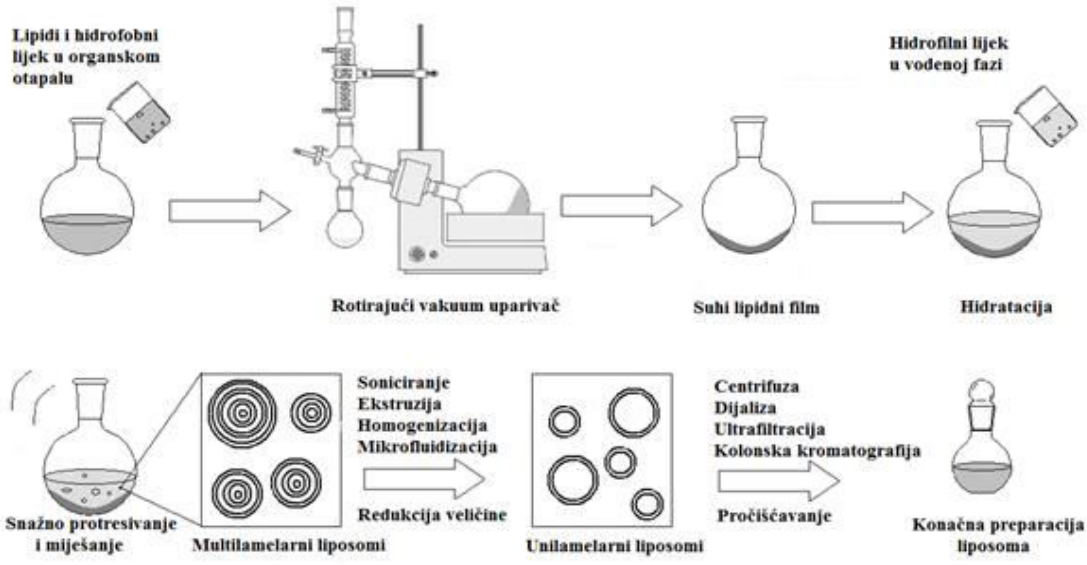
Slika 3. Klasifikacija liposoma prema veličini i broju dvoslojeva (http://www.azonano.com)

1.1.3. Metode pripreme liposoma

Odabirom odgovarajuće metode moguće je pripremiti liposome određene veličine, lamelarnosti i sadržaja uklopljenog lijeka. Gotovo sve metode priprave liposoma uključuju tri ili četiri osnovne faze, a to su: uklanjanje organskog otapala u kojem su fosfolipidi otopljeni, dispergiranje fosfolipida u vodenom mediju, homogenizacija nastale liposomske suspenzije i analiza konačnog produkta. Za sve postupke priprave liposoma vrijedi pravilo da se lipofilni lijekovi dodaju zajedno s fosfolipidima otopljenim u organskom otapalu dok se hidrofilni dodaju otopljeni u vodenoj fazi. Metode priprave liposoma se mogu podijeliti u tri velike skupine: metode fizičkog dispergiranja, dvofaznog dispergiranja i solubilizacije pomoću detergensa (Vanić, 2012b).

1.1.3.1. Metoda hidratacije suhog fosfolipidnog sloja, tzv. film metoda

Film metoda je metoda pripreme liposoma fizičkim dispergiranjem fosfolipida te je najčešći postupak priprave liposoma u laboratorijskim uvjetima. Metoda se temelji na pripremi tankog fosfolipidnog sloja tako da se odvažu lipidne komponente liposoma (fosfolipidi, kolesterol, antioksidansi lipofilne aktivne/djelatne tvari) te otope u tikvici velikog volumena s okruglim dnom koristeći pogodno organsko otapalo ili smjesu organskih otapala. Organsko otapalo (ili njegova smjesa) se nakon toga uklanja na rotacijskom vakuum-uparivaču, a na stijenkama tikvice ostaje suhi transaprentni fosfolipidni film. Dodatkom vodenog medija (pufera) i intenzivnim mućkanjem/dispergiranjem u tikvici sponatno nastaju multilamelarni liposomi različite veličine. Ukoliko se u liposome uklapa hidrofilni lijek, dodaje se otopljen u vodi/puferu (Kalie, 2006; Vanić 2012b).



Slika 4. Shematski prikaz priprave liposoma film metodom (Lopes i sur., 2003)

1.1.3.2. Primjena ciklusa smrzavanja-odmrzavanja (*Freeze-thaw cycles*)

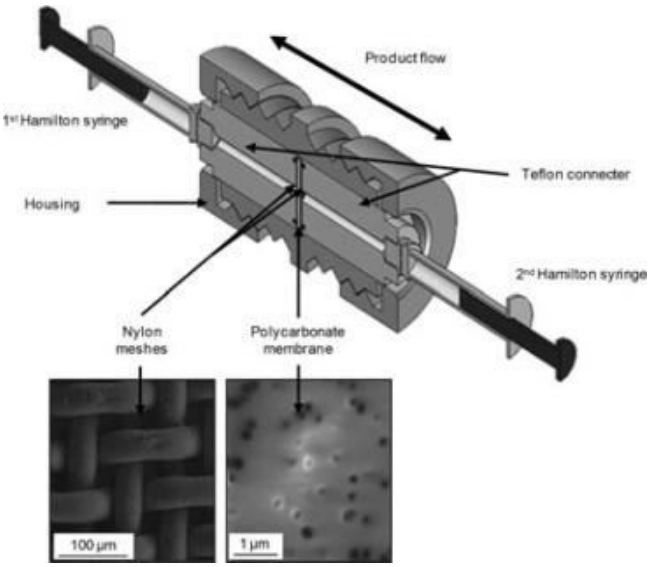
Brojna istraživanja su pokazala da se primjenom ciklusa smrzavanja-odmrzavanja smjese liposoma i otopine pufera s hidrofilnim ljekovitim tvarima može povećati uklapanje hidrofilnih lijekova u liposome. Brzo smrzavanje disperzije liposoma dovodi do stvaranja kristalića leda koji oštećuju membrane te dovodi do fuzije oštećenih liposoma pri čemu nastaju veći liposomi. Zbog reorganiziranja lipidnih membrana novonastalih liposoma, dolazi

do smanjenja lamelarnosti i povećanja međulamelarnog razmaka što dovodi do boljeg uklapanja hidrofilnih tvari u unutarnju vodenu fazu liposoma. Kombinacija brzog smrzavanja i postepenog odmrzavanja pokazuje izvrstan učinak na povećanje uklapanja hidrofilnih tvari u liposome (Kalie, 2006).

1.1.3.3. Metoda ekstruzije

Motoda ekstruzije je jedna od homogenizacijskih metoda kojima se iz MLV liposoma dobivenih film metodom dobivaju uni- ili oligo-lamelarni liposomi određene veličine. Liposomi se ekstrudiraju kroz polikarbonantne membrane određene veličine pora pri čemu velike vezikule pucaju, a dijelovi membrana se odmah rekonstituiraju u nove cjelovite liposome, homogenije raspodjele veličina (Kalie, 2006).

Shematski prikaz ručnog mini-ekstrudera prikazan je Slikom 5. Sastoji se od kućišta u kojem se nalaze dva teflonska odjeljka s centralno položenom uskom cijevčicom. Svaki odjeljak ima na kraju najlonsku mrežicu (promjer pora je 100 μm) koja zadržava gruba onečišćenja iz uzorka. Najlonske mrežice su pričvršćene na teflonske odjeljke gumenom brtvom, a između njih nalazi se polikarbonatna membrana određene veličine pora. Na vanjsko metalno kućište ekstrudera su pričvršćene dvije staklene brizgalice. Protiskivanjem liposomske disperzije iz jedne u drugu brizgalicu uzorak prolazi kroz polikarbonatnu membranu pri čemu dolazi do homogenizacije disperzije te ovisno o broju potiskivanja (ekstruzija) i veličini pora polikarbonatnih membrana nastaju manji oligo-ili unilamelarni liposomi.



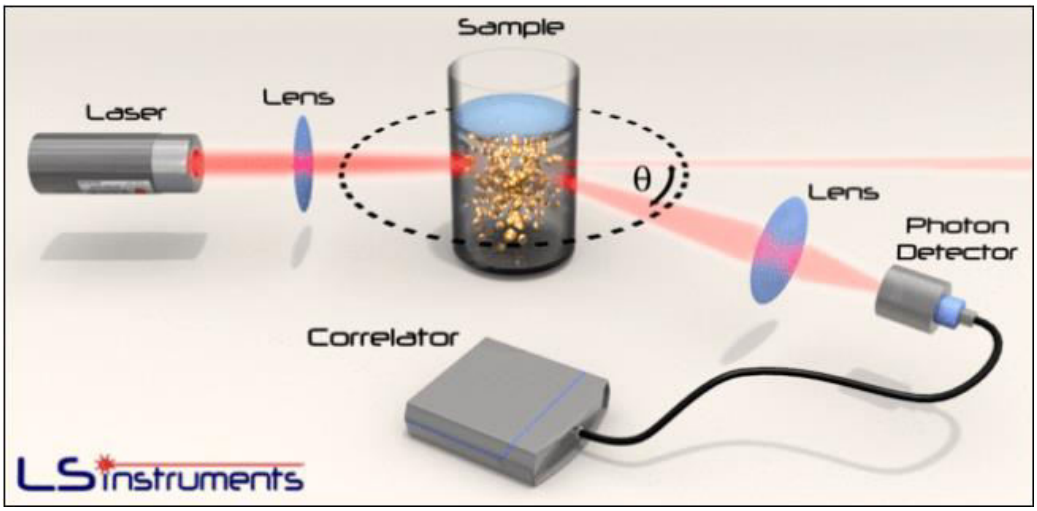
Slika 5. Shematski prikaz ručnog mini-ekstrudera (http://www.jpharmsci.org)

1.1.4. Karakterizacija liposoma fotonskom korelacijskom spektroskopijom

Fotonska korelacijska spektroskopija (eng. *Photon correlation spectroscopy*, PCS) je metoda za kvantitativno određivanje raspodjele veličine čestica koloidno-disperznih sustava. Osnovni princip mjerenja se temelji na osvjetljenju uzorka laserskom zrakom i mjerenju fluktuacije raspršenog svjetla pod zadanim kutem uz pomoć brzog fotonskog detektora. Na mikroskopskoj razini čestice raspršuju svjetlo i na taj način nam daju određene informacije o svom kretanju. Analizom fluktuacije raspršenog svjetla dobivamo vrijednost difuzijskog koeficijenta, D, koji je u korelaciji s radijusom, čestice, R, preko Stokes-Einsteinove jednadžbe:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}$$

Pri čemu je k_B Boltzmannova konstanta [N · m · K^{-1}], T temperatura [K], a η viskoznost otopine uzorka [N · s · m^{-2}] (Kalie, 2006).



Slika 6. Shematski prikaz rada PCS uređaja (http://www.lsinstruments.ch)

1.1.5. Odjeljivanje liposoma s uklopljenom djelatnom tvari od neuklopljene frakcije gel kromatografijom

Gel kromatografija (eng. *Size-exclusion chromatography*, SEC) temelji se na odjeljivanju molekula iz smjese prema njihovoj veličini. Konvencionalne stacionarne faze uglavnom su načinjene od agaroznog gela velikih pora (Bio-gel A150, Sepharose 2B/ CL-2B / 4B / CL-4B), ili križno povezanih polimera dekstrana (Sephadex). U stacionarnoj fazi dolazi do izmjene otopljenih molekula između otapala mobilne faze i istog otapala u porama stacionarne faze. Zadržavanje molekula uzorka u porama gela ovisi o veličini samih molekula: manje molekule prolaze kroz pore gela te se dulje zadržavaju od velikih molekula koje prolaze oko čestica gela, prevaljujući pri tome manji put. Odabir stacionarne faze ovisi o veličini čestica smjese koju želimo odijeliti, dok bi mobilna faza s kojom eluiramo sastavnice smjese trebala biti izoosmolarna s vanjskom i unutarnjom vodenom fazom liposoma kako ne bi došlo do pucanja liposoma uslijed ulaska vode u unutarnju vodenu fazu ili izlaska vode iz unutarnje u vanjsku vodenu fazu (Grabielle-Madelmont i sur., 2003).

1.1.6. Permeabilnost fosfolipidnog dvosloja liposoma i oslobađanje uklopljenog sadržaja iz liposoma

Permeabilnost membrane je bitan aspekt interakcije proteina i drugih molekula s lipidnim dvoslojem bioloških membrana. Inducirano oslobađanje/istjecanje (eng. *leakage*) sadržaja citoplazme djelovanjem na stanične membrane je jedan od najčešćih baktericidnih mehanizama peptida s antimikrobnim i citotoksičnim učinkom. Osim toga, poznavanje permeabilnosti liposomskih membrana (koje nalikuju biološkim membranama) je bitno zbog mogućeg spontanog oslobađanja uklopljenog sadržaja iz fosfolipidnih vezikula koje se koriste kao terapijski nanosustavi za ciljanu dostavu lijeka ili modelne biološke membrane. Istjecanje/oslobađanje uklopljene tvari iz liposoma može biti postupno tako da sve vezikule djelomično oslobađaju svoj sadržaj, tzv. *graded leakage* ili jedan dio vezikula može ispustiti sav sadržaj, dok određeni dio vezikula ostaje intaktan i ne otpušta svoj sadržaj, tzv. *all-or-none leakage* (Ladokhin i sur., 1995).

Graded leakage je uzrokovan kratkotrajnim defektima u membrani koji se homogeno distribuiraju od mjesta nastanka kroz cijelu membranu. Taj efekt ubrzo nestaje ukoliko je nastao zbog asimetričnog umetanja/integriranja peptida (ili surfaktanta) u vanjski monosloj

fosfolipidnog dvosloja liposoma te tako dolazi samo do djelomičnog pražnjenja uklopljenog sadržaja liposoma.

All-or-none leakage je posljedica nastajanja relativno rijetkih, ali velikih pukotina koje dulje ostaju otvorene te tako uzrokuju istjecanje cjelokupnog sadržaja liposoma. Do stvaranja takvih pora dolazi vjerojatno zbog pozitivnog spontanog nabiranja membrane i širenja membrane primarno oko „glave“ fosfolipida pod utjecajem surfaktanta.

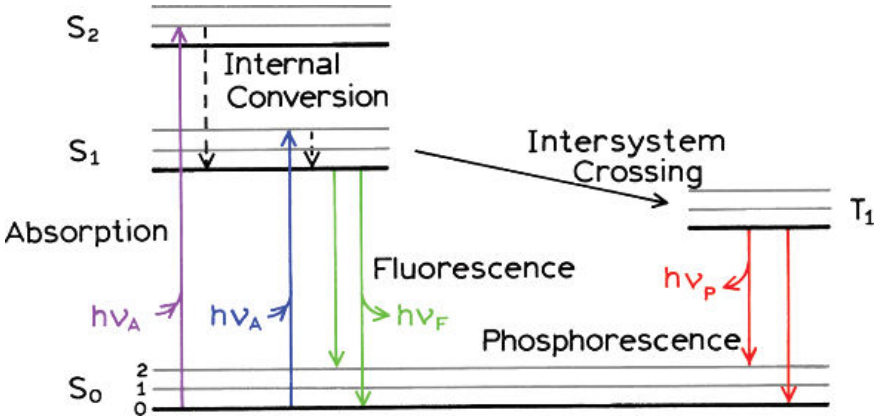
Poznavanje mehanizma oslobađanja/istjecanja sadržaja iz liposoma je nužno kako bi se točnije mogao interpretirati učinak molekula koje uzrokuju oslobađanje sadržaja iz fosfolipidnih (bio)memembrana. (Patel i sur., 2011).

1.2. FLUORESCENCIJA I MJERENJE VREMENA ŽIVOTA FLUORESCENCIJE (*FLUORESCENCE LIFE-TIME ASSAY*)

Tijekom procesa (foto)luminescencije energija primarnog zračenja šalje elektron iz temeljne energetske razine u višu energetsku razinu iz koje se on vraća emisijom sekundarnog zračenja. S obzirom na trajanje sekundarnog zračenja fotoluminescencija se dijeli na:

1. fluorescenciju (traje dok djeluje primarno zračenje) i
2. fosforescenciju, kod koje sekundarno zračenje traje i nakon prestanka primarnog zračenja (Lakowicz, 2010).

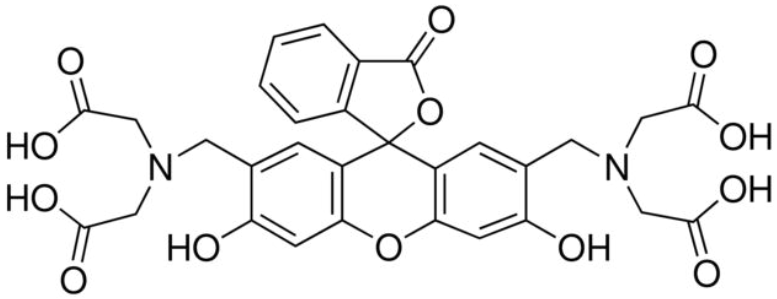
Fluorescencija nastupa kada se elektron pobuđene molekule s više titrajne razine singletnog pobuđenog stanja vraća izravno preko najniže titrajne razine na bilo koju titrajnu razinu osnovnog singletnog stanja i pri tome višak energije emitira u obliku svjetla fluorescencije ($S_1 \rightarrow S_0 + h \cdot \nu_A$; Slika 7). Apsorpcijom kvanta UV-svjetlosti elektron prelazi iz osnovnog singletnog stanja u pobuđeno singletno stanje gdje ostaje 10^{-12}s za koje vrijeme izvodi gibanja translacije i rotacije pa dio primljene energije potroši. Zbog toga emitirano svjetlo ima veću valnu duljinu (λ), a manju energiju od upadnog zračenja.



Slika 7. Energetski dijagram koji opisuje fluorescenciju i fosforescenciju (Jablonski dijagram) (Lakowicz, 2010)

Da bi molekula pokazivala fluorescenciju ona mora imati: krutu strukturu (kako ne bi dobivenu energiju potrošila rotacijom), visoku rezonantnu stabilnost ili konjugirane dvostruke veze (npr. aromatska struktura) te elektron-donirajuću skupinu (kao što je npr. –OH, $–NH_2$). Neke od takvih molekula koje se koriste kao fluorescentni markeri u istraživanju liposoma su fluorescein, 8-aminoftalen-1,3,6-trisulfonska kiselina/ p-ksilen-bispiridin bromid (ANTS-DPX) te kalcein (Lakowicz, 2010).

Kalcein se pokazao najpogodnijim fluorescentnim markerom za ispitavanja integriteta lipidnih dvoslojeva liposoma i oslobađanja uklopljenog sadržaja iz liposoma uporabom fluorimetrijskih metoda (Patel i sur., 2009). Kalcein je hidrofilna fluorescentna boja (marker), slabo topljiva u kiselom i neutralnom, a topljiva u bazičnom pH području (1 M NaOH, 50 mg/ml). U liposomima je kalcein uklopljen u ioniziranom stanju u unutarnju vodenu fazu i stoga ne može spontano penetrirati kroz fosfolipidni dvosloj u vanjsku vodenu fazu (disperzno sredstvo). Zbog svoje strukture (aromatski prsteni, planarna struktura, elektron donorske skupine) (Slika 8) pokazuje pH-ovisnu fluorescenciju kada se obasja svjetlom UV-Vis spektra. Kalcein također pokazuje svojstvo kompleksacije različitih metala pri čemu mu se mijenja valna duljina na kojoj fluorescira, tako da je pri radu s njim potrebno koristiti odgovarajući kompleksacijski agens koji će vezati slobodne metalne ione koji bi mogli dovesti do neželjene promjene u fluorescenciji. Još jedno bitno svojstvo kalceina je gašenje vlastite fluorescencije pri visokim koncentracijama (eng. *self-quenching*) te je zato izvrstan marker za istraživanje mehanizma oslobađanja uklopljenog sadržaja iz liposoma (Kalie, 2006).



Slika 8. Kalcein (www.mpbio.com)

Ispitivanje oslobađanja uklopljenih *self-quenching* hidrofilnih fluorescentnih markera (boja) iz liposoma se upotrebljava za kvantificiranje aktivnosti tvari koje uzrokuju destabilizaciju i stvaranje pora u lipidnim dvoslojevima liposoma. Standardni način mjerenja oslobađanja markera iz liposoma temelji se na stacionarnom mjerenju fluorescencije. Naime, u liposome se uklopi fluorescentni marker koji ima svojstvo gašenja vlastite fluorescencije te se neukopljeni marker ukloni iz vanjske vodene faze. Boja uklopljena u liposome ne pokazuje fluorescenciju dok se liposomi ne tretiraju nekom tvari (agensom) koja uzrokuje destabilizaciju membrane i propuštanje (oslobađanje) uklopljene boje iz unutarnje u vanjsku vodenu fazu. Tada zbog izrazito visokog koncentracijskog gradijenta boja izlazi iz unutarnje vodene faze liposoma u vanjsku vodenu fazu (disperzno sredstvo) te se gubi učinak samogašenja fluorescencije. Jedan od nedostataka ove metode je nemogućnost točne kvantifikacije oslobođene boje (markera), s obzirom da tzv. *de-quenching* parametar nije jednak stvarnom postotku boje koja je oslobođena iz liposoma. Drugi nedostatak je što ova metoda ne razlikuje je li detektirano djelomično otpuštanje/istjecanje fluorescentne boje posljedica toga što samo neki liposomi propuštaju boju kroz svoju membranu (i pri tome cijeli sadržaj liposoma izlazi van), dok drugi liposomi ostaju netaknuti, ili svi liposomi propuštaju određeni udio fluorescentne boje koja je u njih uklopljena.

Jedan od načina rješavanja ovog problema je uklanjanje oslobođene fluorescentne boje iz djelomično ispražnjenih liposoma i naknadno mjerenje fluorescencije, tj. utvrđivanje da li je faktor gašenja (lokalna koncentracija uklopljene boje) ostao isti (tada imamo *all-or-none leakage*) ili se smanjio.

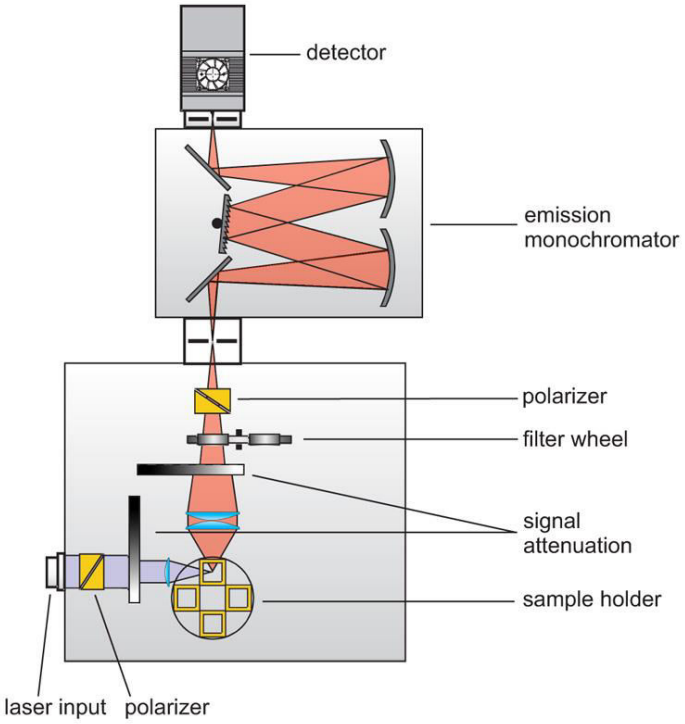
Druga sofisticiranija metoda, koja je korištena u ovom radu, je vremenski razlučivo mjerenje fluorescencije mjerenjem vremena života fluorescencije korištenjem samogašeće fluorescentne boje. Analiza dobivenih rezultata provodi se metodom prilagodbe bieksponencijalne krivulje (eng. *biexponential curve fit*) koja omogućuje paralelnu kvantifikaciju frakcija uklopljene i oslobođene boje te njihove efektivne koncentracije.

Ovakva analiza omogućuje razlikovanje mehanizma oslobađanja uklopljenog sadržaja iz liposoma (1.1.6.), kvantificira količinu oslobođene fluorescentne boje te je neovisna o mnogim vanjskim utjecajima koji su prisutni kod stacionarnog mjerenja intenziteta fluorescencije (Patel i sur., 2009).

Vrijeme života fluorescencije (eng. *fluorescence lifetime*, τ) je prosječno vrijeme potrebno da se ekscitirani elektron vrati u osnovno stanje nakon pobuđivanja. Vrijeme života fluorescencije je karakteristično za svaku fluorescentnu molekulu te se može koristiti za identifikaciju tvari. Ono također ovisi i o kemijskom okruženju fluorescentne tvari tako da se promjene u vremenu fluorescencije mogu koristiti za karakterizaciju kemijskog okruženja. Osim o okruženju, vrijeme života ovisi i o raznim procesima kao što su: flourescentno rezonantni prijenos energije (eng. *fluorescence resonance energy transfer*, FRET), gašenje fluorescencije (tzv,*quenching*), izmjena naboja, dinamika otapala ili rotacija molekule (Lakowicz, 2010).

Vremenski korelirano pojedinačno brojanje fotona (eng. *time-correlated single photon counting*, TCSPC) se koristi za utvrđivanje vremena života fluorescencije. U TCSPC-u se mjeri vrijeme između ekscitacije pulsnim laserom i dolaska fotona emitiranog zračenja do detektora. Za TCSPC je potreban definirani početni signal, kojeg daje elektronika koja upravlja laserskim implusom ili fotodiodom i završni signal, koji je definiran detektorom osjetljivim na pojedinačne fotone. Mjerenje ovog vremena se uzastopno ponavlja te se rezultati mjerenja tj. vrijeme između početnog i završnog signala nanosi na histogram koji prikazuje pojavu emisije zračenja nakon ekscitacije laserskim impulsom u ovisnosti o vremenu (www.picoquant.com).

Slika 9 prikazuje osnovne dijelove uređaja za mjerenje vremena života fluorescencije: pulsni laser, monokromator ili optički filter koji odjeljuje fluorescencijski signal od ekscitacijskog zračenja i detektor koji mjeri vrijeme između ekscitacije i emisije fluorescentnog zračenja (www.picoquant.com).



Slika 9. Shemtski prikaz uređaja za mjerenje vremena života fluorescencije (www.picoquant.com)

1.3. ŽUČNE SOLI

Žučne soli su natrijeve i kalijeve soli žučnih kiselina, spojeva steroidne strukture izoliranih iz žuči (probavnog sekreta) kojeg jetra izlučuje u tanko crijevo. Žučne kiseline nastaju u jetri iz kolesterola te imaju važnu ulogu u probavi masti jer zbog svojih amfipatskih svojstava djeluju kao emulgatori, tj. olakšavaju topljivost masti u vodenom mediju.

Žučne kiseline se dijele na:

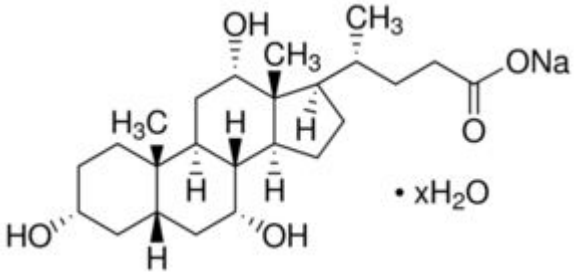
1. primarne žučne kiseline – sintetizira ih jetra
2. sekundarne žučne soli – nastaju mikrobnom razgradnjom u debelom crijevu

Primarne žučne kiseline su: kolna, glikokolna, taurokolna, deoksikolna, henodeoksikolna, glikohenodeoksikolna, taurohenodeoksikolna i litokolna kiselina (Hall, 2015).

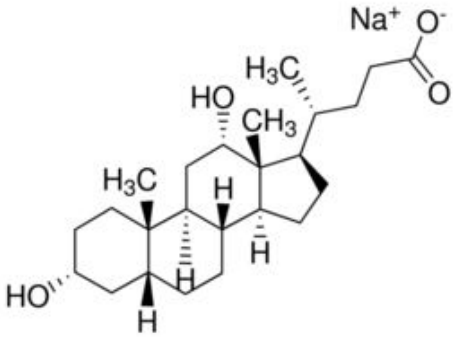
U ovom radu korištene su natrijeve soli kolne, deoksikolne i taurokolne kiseline (Slike 10-12).

Zbog svojih amfipatskih svojstava žučne soli permeiraju u fosfolipidnu membranu liposoma uzrokujući povećanje fluidnosti i permeabilnosti lipidnih dvoslojeva. Ovaj učinak ovisi o:

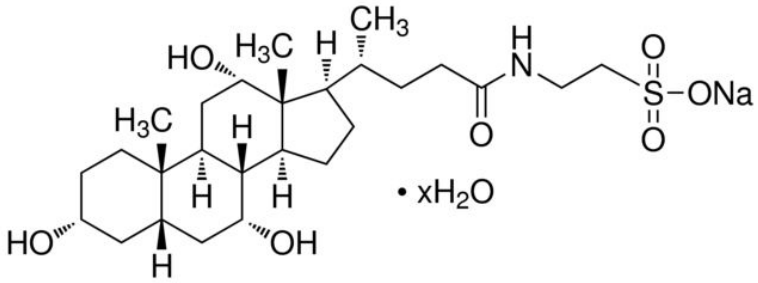
broju –OH skupina u žučnim solima, konjugaciji s drugim kiselinama kao što su glicin i taurin te o naboju same žučne soli i liposomske membrane (Schubert, 1983).



Slika 10. Na-kolat hidrat (www.sigmaaldrich.com)



Slika 11. Na-deoksikolat (www.sigmaaldrich.com)



Slika 12. Na-taurokolat hidrat (www.sigmaaldrich.com)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Žučne soli su prirodni emulgatori s poznatim destruktivnim učinkom na fosfolipidne membrane. Pretpostavlja se da žučne soli mogu povećati permeabilnost membrane ugrađivanjem (integriranjem) u nju te tako povećati protok tvari kroz membranu. Kako bi se dobio bolji uvid u mehanizam njihovog djelovanja na biološke membrane, pripravljeni su liposomi iz fosfatidilkolina te je provedeno istraživanje oslobađanja uklopljenog sadržaja iz liposoma pod utjecajem žučnih soli. U liposome je uklopljen hidrofilni fluorescentni marker kalcein u vrlo visokoj koncentraciji pri kojoj pokazuje učinak samogašenja fluorescencije. Oslobađanje kalceina iz liposoma pod utjecajem različitih žučnih soli mjereno je pomoću uređaja za vremenski korelirano pojedinačno brojanje fotona. Tom metodom se mogla odrediti točna količina oslobođenog kalceina te utvrditi način njegovog otpuštanja iz liposoma *(all-or-none* ili *graded leakage)*. Na osnovu dobivenih rezultata moguće je dobiti više informacija o pojavi nepravilnosti u membrani zbog kojih dolazi do različitih mehanizama oslobađanja uklopljenog sadržaja iz fosfolipidnih vezikula.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

Instrumenti i pribor:

- termostatirana peć (APT line™ ED (E2), Binder, Tuttlingen, Njemačka)
- UV-Vis spektrofotometar (Ultrospec® 2000, Pharmacia Biotech, NJ, SAD)
- ekstruder (LipoFast™, Avestin, Inc., Kanada)
- polikarbonatne membrane veličine pora 100 nm (LipoFast™, Avastin, Inc., Kanada)
- Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija)
- pulsni diodni laser (PDL 800-D Picosecond, PicoQuant, Berlin, Njemačka)
- uređaj za vremenski korelirano pojedinačno brojanje fotona (TCSPC) (FluoTime 100, PicoQuant, Berlin, Njemačka)
- softver za analizu podataka dobivenim TCSPC-om (FluoFit verzija 4.6, PicoQuant, Berlin, Njemačka)

Kemikalije:

- kloroform (Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Njemačka)
- Lipoid EPC S, >96% fosfatidilkolina, (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Njemačka)
- kalcein (Sigma-Aldrich, Tokio, Japan)
- Tris-Pufferan® ≥99,9% p.a (Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Njemačka)
- natrijev klorid ≥ 99% (Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Njemačka)
- etilendiamin tetraklorna kiselina (EDTA) (Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Njemačka)
- natrijev deoksikolat ≥ 97% (Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Njemačka)
- natrijev kolat hidrat iz ovčje žuči ≥ 99% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- natrijev taurokolat hidrat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)
- sustav za gel filtraciju (Sepharose™ CL-4B, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedska)
- sumporna kiselina, 96% (Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Njemačka)
- fosfatna kiselina (Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Njemačka)
- amonijev molibdat (Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Njemačka)

- Fiske-Subarrow reducens 740 mg / 5 ml (natrij hidrogensulfat) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- vodikov peroksid, 30% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)

Sve korištene kemikalije odgovarale su zahtjevima čistoće Europske farmakopeje.

3.2. METODE

3.2.1. Priprema Tris pufera

Otopina Tris pufera (110 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,5 mM EDTA, pH = 8,5) pripremljena je odvagom 12,8568 g NaCl, 0,37224 g EDTA te 2,4228 g Tris u odmjernoj tikvici volumena 2 l te je nadopunjena do oznake ultračistom vodom (dobivena uzastopnom filtracijom i deionizacijom, Mili-Q, Merck Milipore, SAD). pH pufera je podešen na pH 8,52 korištenjem razrijeđene kloridne kiseline. Iz pufera je uklonjen zrak uz pomoć vakuum pumpe i magnetskog mješača koji je udarao o stijenke boce.

3.2.2. Priprema otopine kalceina

Otopina kalceina (70 mM kalcein, 10 mM Tris, 0,5 mM EDTA, pH 8,5) pripremljena je odvagom 1,07861 g kalceina, 0,00465 g EDTA i 0,03102 g Tris-a. Odvagane tvari su kvantitativno prenesene u staklenu čašu od 50 ml te je dodano malo ultračiste vode, a otopina je miješana pomoću magnetskog mješača. U otopinu je dodavana otopina NaOH (10N) dok se sav prah kalceina nije otopio, potom je izmjeren pH pomoću pH-metra te je podešen na 8,45 (dodatkom 0,5 M klorovodične kiseline). Ta otopina je potom kvantitativno prenešena u odmjernu tikvicu volumena 25 ml te nadopunjena do oznake ultračistom vodom.

3.2.3. Priprema kolone za gel kromatografiju

Sepharose CL-4B je prvo isprana s ranije pripremljenim Tris puferom na Büchenrovom lijevku pod tlakom od 120 mbar (vakuum pumpa) te je premještena u staklenu bocu s plastičnim čepom. Iz disperzije je uklonjen zrak uz pomoć vakuum pumpe i

magnetskog mješača koji je udarao o stijenke boce. Postupak je provođen 10 min pri tlaku od 120 mbar.

Diseprzija Sepharose CL-4B u Tris puferu je potom oprezno prenešena u staklenu kolonu pri čemu je kolona bila otvorena kako bi višak pufera mogao otjecati, a sefarozni gel sedimentirati na dno kolone.

3.2.4. Priprema liposoma

Fosfatidilkolin (EPC) liposomi pripremeljeni su metodom hidratacije suhog fosfolipidnog sloja tzv. film metodom. U tikvicu okruglog dna stavljeno je 339,3 µl ranije pripravljene standardne otopine EPC-a u kloroformu (88,43 mM) kako bi se pripremio 30 mM EPC film. Ta otopina uparena je na rotacijskom vakuum uparivaču u vodenoj kupelji na 40ºC, kako bi se osiguralo otparavanje kloroforma. Tlak u vakuumskom uparivaču se s početnih 400 mbar postpuno snižavao na 20 mbar, a brzina rotacije tikvice s okruglim dnom je bila 170 okretaja/min. Nakon toga se film 3 sata sušio pod visokim vakuumom kako bi bili sigurni da je sav kloroform uklonjen iz filma.

Nastali tanki, prozirni, fosfolipidni film je hidratiziran dodatkom 1 ml otopine kalceina u Tris puferu (10 mM Tris, 0,5 mM EDTA, pH= 8,5) te je tikvica 30 min rotirana brzinom od 170 okretaja/min kako bi sav lipid izreagirao (hidratizirao).

Učinjeno je 5 ciklusa smrzavanja-odmrzavanja tako da je tikvica naizmjenično stavljana u zamrzivač na -20 ºC dok se otopina ne bi smrznula te nakon toga odmrzavana na sobnoj temperaturi.

Nastala liposomska suspenzija je pomoću ručnog mini-ekstrudera protiskivana 10 puta kroz polikarbonatnu membranu veličine pora 400 nm te potom još 41 put kroz membranu veličine pora 100nm. Na taj način prvotno nastali veliki, multilamelarni liposomi postaju manji, oligolamelarni i unilamelarni, tj. dolazi do homogenizacije liposomske disperzije.
Tako priređena disperzija liposoma pohranjena je u hladnjak na 4 °C. Prije svakog ispitivanja termostatirana je na sobnoj temperaturi i čuvanja zaštićena od svjetlosti.

3.2.5. Određivanje srednjeg promjera i indeksa polidisperznosti liposoma

Srednji promjer liposomai indeks polidisperznosti izmjereni su pomoću uređaja Zetasizer Nano ZS metodom fotonske korelacijske spektroskopije *(eng. Photon correlation*

spectroscopy, PCS*).* Mjerenje je provedeno pod kutem raspršenja od 90º i pri temperaturi od 25ºC. U kivetu za mjerenje veličine čestica stavljeno je 10 µl ekstrudiranih liposoma razrjeđenih s 4 ml 10 mM Tris pufera. Tris pufer prethodno je filtriran kroz Minisart filtere veličine pora 0,45 µm kako bi se uklonila eventualna onečišćenja (čestice prašine).

3.2.6. Odjeljivanje liposoma s uklopljenim kalceinom gel kromatografijom

Liposomi s uklopljenim kalceinom odijeljeni su od neuklopljenog kalceina postupkom gel kromatografije (gel filtracije) na koloni punjenoj sa Sepharosom CL-4B. 100 µl ekstrudirane liposomske suspenzije nanešeno je na kolonu, te je nakon ulaska disperzije liposoma u gel dodano malo Tris pufera (da se izbjegne razrjeđivanje suspenzije). Eluacija frakcije liposoma s uklopljenim kalceinom provedena je postupnim dodavanjem Tris pufera na kolonu (Slika 11) te je na kraju sakupljeno oko 500 µl liposomske frakcije s kalceinom u Eppendorfovoj epruveti, dok je neuklopljeni kalcein skupljen u čašu.
Slika 13 prikazuje eluaciju liposoma na koloni. Gornja žuta i tamno narančasta frakcija predstavlja slobodni (neuklopljeni) kalcein koji zbog male veličine (Mr = 622,53) zaostaje na koloni (ulazi u čestice gela), dok se liposomi s uklopljenim kalceinom vide kao žuto obojena (donja) frakcija. Tijekom gel filtracije, liposomi zbog svoje veličine prolaze između čestica Sepharosnog gela te se prvi eluiraju s kolone, za razliku od neuklopljenog kalceina.



Slika 13. Odjeljivanje liposomski uklopljenog od neuklopljenog kalceina gel kromatografijom na koloni punjenoj Sepharosom CL-4B.

3.2.7. Određivanje koncentracije fosfolipida u eluiranoj frakciji liposoma Bartlett-ovom metodom

Budući da je originalno pripravljena disperzija liposoma ekstrudirana kroz 400 i 100-nm polikarbonatne membrane te razrijeđena tijekom gel kromatografije, potrebno je odrediti točnu koncentracija fosfolipida u odijeljenim liposomima s kalceinom zbog daljnjih ispitivanja liposoma sa žučnim solima.

Pripremljeno je 9 uzoraka u epruvetama koje su uključivale: 1 slijepu probu, 7 otopina za kalibraciju te 1 uzorak koji sadrži eluirane liposome s uklopljenim kalceinom. U svaku od 7 kalibracijskih uzoraka je dodan predviđeni volumen 1 mM fosfatnog pufera (Tablica 1). U slijepu probu nije ništa dodano, dok je u 9. epruvetu dodano 10 µl liposomske disperzije. Sve epruvete su nadopunjene do 5 ml ultračistom vodom. Odvagana je masa svake epruvete prije i poslije dodatka probe (fosfatnog pufera ili liposomske disperzije) kako bismo odredili masu dodane tvari.

Nakon toga je u svaku epruvetu dodano 500 µl 10N (5M) sulfatne kiseline, epruvete su intenzivno promućkane na *Vortex* uređaju te se zagrijavane u termostatiranoj peći na 160 ºC. Epruvete su nakon 3 sata izvađene iz peći; svakoj je dodano 200 µl 30% vodikovog peroksida te su ponovno vraćene u peć na grijanje (160 ºC) narednih 90 minuta.

Probe se izvađene iz termostatirane peći, ostavljene da se malo ohlade te je svakoj dodano 4,5 ml 0,22% otopine amonijevog molibdata, 0,2 ml svježe pripravljenog Fiske-Subarowog reducensa (740 mg praha Fiske-Subarowog reducensa je otopljeno u 5 ml destilirane vode). Sadržaj svih epruveta je intenzivno izmućkan na *Vortex* mješalici.

Sve epruvete su potom inkubirane 10 minuta na 95 ºC u metalnom inkubatoru.

Kada su se probe dobro ohladile, izmjerenaje apsorbancija uzoraka iz svake epruvete na 830 nm koristeći slijepu probu za kalibraciju uređaja.

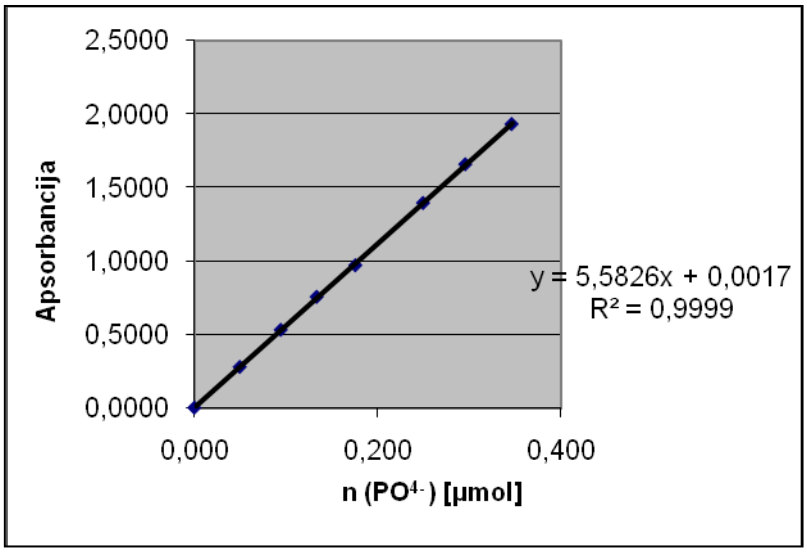
Izmjerene apsorbancije prikazane se u Tablici 1.

Tablica 1. Probe za Bartlett-analizu

Proba broj	Oznaka probe	c(PO^{4-}) [µmol]	Volumen [µL]	Odvaga uzorka [mg]	Apsorbancija (820 nm)
1.	Slijepa proba	0	0	0,00	0,0000
2.	Kalibracija 1	0,05	50	49,50	0,2780
3.	Kalibracija 2	0,1	100	94,40	0,5310
4.	Kalibracija 3	0,15	150	133,60	0,7560
5.	Kalibracija 4	0,2	200	175,80	0,9710
6.	Kalibracija 5	0,25	250	249,80	1,3960
7.	Kalibracija 6	0,3	300	296,00	1,6600
8.	Kalibracija 7	0,35	350	346,60	1,9340
9.	Liposomi s kalceinom		10	9,50	0,226

Pomoću korelacijske analize izmjerenih apsorbancija i odvagane mase fosfata u kalibracijskim otopinama načinjenje kalibracijski pravac ovisnosti apsorbancije o masi fosfata u otopini (Slika 14). Linearnost metode izražena je koeficijentom korelacije (R = 0,9999).

Iz jednadžbe dobivenog pravca određenaje koncentracija fosfata u uzorku liposoma s kalceinom (Tablica 2). S obzirom da su liposomi sastavljeni od fosfatidilkolina, tj. imaju fosfat u svojoj strukturi, iz dobivene množine fosfata u otopini izračunata je stvarna koncentracija fosfolipida u frakciji liposoma dobivenoj nakon odjeljivanja na koloni.



Slika14. Kalibracijski pravac otopine fosfatnog pufera

Tablica 2. Određivanje koncentracije fosfolipida u eluiranoj frakciji liposoma s kalceinom

Opis parametra	**Vrijednost**
Masa probe [mg] = volumen probe [µl]	9,5
Apsorbancija (820 nm)	0,226
n (PO^{4-}) [µmol]	0,040
Koncentracija fosfolipida [mM]	4,2

3.2.8. Priprema standardnih otopina žučnih soli

3.2.8.1. Priprema standardne otopine natrijeva kolata

Standardna otopina natrijevog kolata (hidrata) koncentracije 10 mM (Mw = 430,55 g/mol) je pripremljena otapanjem 0,0218 g natrijevog kolata (hidrata) u 5,063 g ultračiste vode u epruveti od 10 ml vrtloženjem na *Vortex* mješalici.

3.2.8.2. Priprema standardne otopine natrijeva deoksikolata

Standardna otopina natrijevog deoksikolata (hidrata) koncentracije 10 mM (Mw = 414,55 g/mol) je pripremljena otapanjem 0,0241 g natrijevog kolata (hidrata) u 5,814 g ultračiste vode u epruveti od 10 ml vrtloženjem na *Vortex* mješalici.

3.2.8.3. Priprema standardne otopine natrijeva taurokolata

Standardna otopina natrijevog taurokolata (hidrata) koncentracije 10 mM (Mw = 537,68 g/mol) je pripremljena otapanjem 0,0312 g natrijevog kolata (hidrata) u 5,803 g ultračiste vode u epruveti od 10 ml vrtloženjem na *Vortex* mješalici.

3.2.9. Mjerenje vremena života fluorescencije

Slika 15 prikazuje FluoTime 100 uređaj za mjerenje života fluorescencije. U njemu dolazi do pobuđivanja uzorka, koji se nalazi u crnom kućištu zaštićen od vanjskog svjetla,

laserskom zrakom (prikazan je samo utor za laser). Na uređaju je moguće postaviti željenu transmisiju te mijenjati optičke filtre koji odjeljuju fluorescencijski signal od ekscitacijskog zračenja. U uređaju se nalazi i detektor koji mjeri vrijeme između ekscitacije i emisije fluorescentnog zračenja.



Slika 15. FluoTime 100 (www.picoquant.com)

3.2.9.1. Ispitivanje utjecaja natrijevog kolata na permeabilnost liposoma s kalceinom

Pripremljeno je 11 otopina natrijevog kolata različitih koncentracija razrjeđivanjem odgovarajuće količine standardne otopine natrijeva kolata (koncentracije 10 mM) Tris puferom u kivetama za mjerenje fluorescencije (Tablica 3). Potom je u svaku otopinu dodano 8 µl liposoma s uklopljenim kalceinom (standardna otopina liposoma) u kojima je koncentracija fosfolipida, određena Bartlett metodom, iznosila 4,2 mM. Kivete su nadopunjene Tris puferom na ukupan volumen od 2 ml.

Napravljena je također po jedna slijepa proba razrjeđivanjem 8 µl standardne disperzije liposoma s Tris puferom do 2 ml (Tablica3).

Uređaj je kalibriran slijepom probom sa standardnom otopinom Ludoxa u Tris puferu koncentracije jednake koncentraciji fosfolipida u ispitivanim probama. Otopina Ludoxa poslužila je za uklanjanje interferencije lasera. Potom je izmjereno vrijeme života

fluorescencije molekula kalceina u svakoj od 12 proba u vremenskim intervalima od 0 min, 10 min, 30 min, 1h, 2h i 3h.

Mjerenje je izvršeno na pulsnom fluorimetru, FluoTime 100 (PicoQuant). Pobudno zračenje proizvedeno je pomoću lasera koji je pulsirao frekvencijom od 20 MHz na valnoj duljini od 465 nm. Opadanje intenziteta fluorescencije je mjereno na 530 nm dok je broj fotona koje uređaj detektira pri takvom mjerenju ograničen na 10.000. Transmisija zračenja postavljena je na 1%.

Tablica 3. Priprava uzoraka liposoma s natrijevim kolatom

Proba br.	**c (Na kolat) [mM]**	**V (s.o. Na-kolat) [µl]**	**c (fosfolipida) [mM]**	**V (s.o. liposoma) [µl]**	**V (Tris pufer) [µl]**
1	0	0	16,5	8	1992
2	1	200	16,5	8	1792
3	1,5	300	16,5	8	1692
4	1,75	350	16,5	8	1642
5	2	400	16,5	8	1592
6	2,125	425	16,5	8	1567
7	2,25	450	16,5	8	1542
8	2,5	500	16,5	8	1492
9	2,75	550	16,5	8	1442
10	3	600	16,5	8	1392
11	3,25	650	16,5	8	1342
12	3,5	700	16,5	8	1292

s.o., standardna otopina (disperzija)

3.2.9.2. Ispitivanje utjecaja natrijevog deoksikolata na permeabilnost liposoma s kalceinom

Pripremljeno je 6 otopina natrijevog deoksikolata različitih koncentracija razrjeđivanjem odgovarajuće količine standardne otopine natrijevog deoksikolata(koncentracije 10 mM) s Tris puferom u kivetama za mjerenje fluorescencije. Potom je u svaku otopinu dodano 8 µl liposoma s uklopljenim kalceinom (standardna otopina

liposoma) u kojima je koncentracija fosfolipida, određena Bartlett metodom, iznosila 4,2 mM. Kivete su nadopunjene Tris puferom na ukupan volumen od 2 ml (Tablica 4).
Napravljena je također po jedna slijepa proba razrjeđivanjem 8 µl standardne disperzije liposoma s Tris puferom do 2 ml (Tablica 4).

Uređaj je kalibriran slijepom probom sa standardnom otopinom Ludoxa u Tris puferu koncentracije jednake koncentraciji fosfolipida u ispitivanim probama. Otopina Ludoxa poslužila je za uklanjanje interferencije lasera. Potom je izmjereno vrijeme života fluorescencije kalceina u svakoj od 7 proba u vremenskim intervalima od 0 min, 10 min, 30 min, 1h, 2h i 3h.

Mjerenje je izvršeno na pulsnom fluorimetru, FluoTime 100 (PicoQuant). Pobudno zračenje proizvedeno je pomoću lasera koji je pulsirao frekvencijom od 20 MHz na valnoj duljini od 465 nm. Opadanje intenziteta fluorescencije je mjereno na 530 nm dok je broj fotona koje uređaj detektira pri takvom mjerenju ograničen na 10.000. Transmisija zračenja postavljena je na 1%.

Tablica 4. Priprava uzoraka liposoma s natrijevim deoksikolatom (Na-DK)

Proba br.	**c (Na-DK) [mM]**	**V (s.o. Na-DK) [µl]**	**c (fosfolipida) [mM]**	**V (s.o. liposoma) [µl]**	**V (Tris pufer) [µl]**
1	0	0	16,5	8	1992
2	0,125	25	16,5	8	1967
3	0,25	50	16,5	8	1942
4	0,35	70	16,5	8	1922
5	0,5	100	16,5	8	1892
6	0,6	120	16,5	8	1872
7	0,75	150	16,5	8	1842

Na-DK, natrijev deoksikolat;s.o., standardna otopina (disperzija)

3.2.9.3. Ispitivanje utjecaja natrijevog taurokolata na permeabilnost liposoma s kalceinom

Pripremljeno je 8 otopina natrijevog taurokolata različitih koncentracija razrjeđivanjem odgovarajuće količine standardne otopine natrijeva taurokolata, koncentracije 10 mM, s Tris puferom u kivetama za mjerenje fluorescencije. Potom je u svaku otopinu dodano 8 µl

liposoma s uklopljenim kalceinom (standardna otopina liposoma) u kojima je koncentracija fosfolipida, određena Bartlett metodom, iznosila 4,2 mM. Kivete su nadopunjene Tris puferom na ukupan volumen od 2 ml (Tablica 5).

Napravljena je također po jedna slijepa proba razrjeđivanjem 8 µl standardne disperzije liposoma s Tris puferom do 2 ml (Tablica 5).

Uređaj je kalibriran slijepom probom sa standardnom otopinom Ludoxa u Tris puferu koncentracije jednake koncentraciji fosfolipida u ispitivanim probama. Otopina Ludoxa poslužila je za uklanjanje interferencije lasera. Potom je izmjereno vrijeme života fluorescencije kalceina u svakoj od 9 proba u vremenskim intervalima od 0 min, 10 min, 30 min, 1h, 2h i 3h.

Mjerenje je izvršeno na pulsnom fluorimetru, FluoTime 100 (PicoQuant). Pobudno zračenje proizvedeno je pomoću lasera koji je pulsirao frekvencijom od 20 MHz na valnoj duljini od 465 nm. Opadanje intenziteta fluorescencije je mjereno na 530 nm dok je broj fotona koje uređaj detektira pri takvom mjerenju ograničen na 10.000. Transmisija zračenja postavljena je na 1%.

Tablica 5. Priprava uzoraka liposoma s natrijevim taurokolatom (Na-TK)

Proba br.	**c (Na-TK) [mM]**	**V (s.o. Na-TK) [µl]**	**c (fosfolipida) [mM]**	**V (s.o. liposoma) [µl]**	**V (Tris pufer) [µl]**
1	0	0	16,5	8	1992
2	0,25	50	16,5	8	1942
3	0,5	100	16,5	8	1892
4	1	200	16,5	8	1792
5	1,125	225	16,5	8	1767
6	1,25	250	16,5	8	1742
7	1,5	300	16,5	8	1692
8	1,75	350	16,5	8	1642
9	2	400	16,5	8	1592

Na-TK, natrijev taurokolat;s.o., standardna otopina (disperzija)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Srednji promjer liposoma i indeks polidisperznosti

Određivanje srednjeg promjera i indeksa polidisperznosti ekstrudiranih liposoma s kalceinom provedeno je PCS metodomna način detaljno opisan u poglavlju 3.2.5.

Srednji promjer liposoma od 141,7 nm i vrijednost indeksa polidesperznosti od 0,062 ukazuju na izrazito homogenu preparaciju unilamelarnih liposoma. Takvi rezultati bili su i očekivani s obzirom da je izvorna preparacija liposoma povrgnuta intenzivnoj ekstruziji; 10 puta kroz polikarbonatnu membranu veličine pora 400 nm te potom još 41 put kroz membranu veličine pora 100 nm.

Homogena raspodjela veličina liposoma u liposomskoj disperziji od velike je važnosti za daljnja istraživanja utjecaja žučnih soli na mehanizam oslobađanja uklopljenog sadržaja iz liposoma. U slučaju heterogene distribucije veličina, liposomi bi, zbog različite veličine (promjera), oslobađali različiti udio uklopljenog kalceina te se ne bi mogao dobiti dobar uvid u interakcije sa žučnim solima.

4.2. Određivanje vremena života fluorescencije kalceina i udjela oslobođenog kalceina iz liposoma (*efflux*)

TCSPC metodom određeno je vrijeme života fluorescencije kalceina uklopljenogu liposome te udjela kalceina kojijezbog učinka žučnih solioslobođeniz liposoma. Mjerenje je napravljeno u ovisnosti o vremenu inkubacije liposoma s otopinama žučnih soli (natrijev kolat, deoksikolat i taurokolat) različitih koncentracija. Dobivene krivulje koje prikazuju pad intenziteta fluorescencije analzirane su metodom prilagodbe bieksponencijalnekrivulje (eng. *biexponential curve fit*) korištenjem programa FluoFit (PicoQuant, Njemačka). Vrijednost života fluorescencije slobodne frakcije kalceina (τ_F) podešena je kao konstantna vrijednost na 4,0 ns, s obzirom da je to približna vrijednost vremena fluorescencije koju nevezana molekula kalceina pokazuje pri pH 8,5, a kada ne dolazi do samogašenja (eng. *self-quenching*) fluorescencije uslijed visoke koncentracije kalceina. Vrijednosti života fluorescencije uklopljenog kalceina (τ_E) izračunate su matematičkom obradom dobivene krivulje. Oblik matematičke analize podataka prilagodbom krivulje u FluoFitu bio je *exponential reconvolution.* Navedeni parametri su se u prijašnjim ispitivanjima vremena života

fluorescencije samogašećih fluorofora pokazali najuspješnijima (Patel i sur. 2009) pa su korišteni i u ovom ispitivanju.

Matematičkom analizom podataka mjerenja dobiveni su podatci o vremenu života fluorescencije slobodnog (τ_F) i uklopljenog kalceina (τ_E) te preeksponencijiski faktor B za slobodne (B_F) i uklopljene molekule kalceina (B_E). Preeksponencijski faktor B je proporcionalan količini fluorescentne boje. Udio kalceina oslobođen iz liposoma (E, *efflux*) izračunat je korištenjem formule:

$$E = \frac{(B_F - B_{F0})}{(B_F - B_{F0} + Q_{stat} B_E)}$$

B_{F0} je preeksponencijski faktor slobodnog kalceina kada u ispitivanom uzorku nema tenzida (žučne soli) te se koristi kako bi se ispravilo moguće nepotpuno odvajanje slobodnog kalceina od liposomski uklopljenog kalceina na kromatografskoj koloni. Q_{stat}je statički faktor gašenja fluorescencije (*eng. static quenching factor*) koji uzima u obzir da je određena količina uklopljenog kalceina nevidljiva detektoru zbog dimerizacije molekule u osnovnom stanju. Q_{stat} je jednak 1,2 te je konstantna vrijednost u provedenim izračunima, budući da se koristilia samo jedna fluorescenta boja, kalcein (Patel i sur. 2009).

Tablice 6a-e prikazuju dobivene preeksponencijalne faktore i vremena života fluorescencije kao i količinu oslobođenog kalceina u ovisnosti o koncentraciji natrijeva kolata i vremenu inkubacije.

Slike 16, 17 i 18 prikazuju grafove ovisnosti promjene količine oslobođenog kalceina (E, *efflux*), promjene preeksponencijalnih faktora slobodnog (B_f) i uklopljenog kalceina (B_e), promjene vremena života fluorescencije slobodnog (τ_f) i uklopljenog kalceina (τ_e) o koncentraciji natrijevog kolata u kojem su liposomi inkubirani, nakon 180 minuta inkubacije.

Tablica 6a. Liposomi inkubirani 10 minuta u otopini natrijevog kolata

c (Nakolat) [mM]	**B_f**	**τ_f**	**B_e**	**τ_e**	**Oslobođeni kalcein (E)**
0	212,2	4	12262	0,5506	0
1	251,3	4	12745	0,5463	0,00255
1,50	324	4	12929	0,5435	0,00715
1,75	359,5	4	12793	0,5385	0,00950
2	415,6	4	13094	0,5397	0,01278
2,125	433,3	4	13015	0,5409	0,01396
2,25	430,5	4	12882	0,5476	0,01393
2,5	507,6	4	12517	0,5543	0,01929
2,75	1104	4	11864	0,5931	0,05895
3	1460,6	4	11431	0,6057	0,08342
3,25	5161,7	4	6313	1,0677	0,39517
3,5	5993,6	4	5316	1,2257	0,47542

Svi uzorci sadržavali su 8 µl suspenzije liposoma. Oslobođeni kalcein (E) je vrijednost u intervalu 0-1, tako da je 0 početno stanje u kojem još nema izlaska kalceina iz liposoma, a 1 predstavlja izlazak svog kalceina iz liposoma.

Tablica 6b. Liposomi inkubirani 30 minuta u otopini natrijevog kolata

c (Nat-kolat) [mM]	**B_f**	**τ_f**	**B_e**	**τ_e**	**Oslobođeni kalcein (E)**
0	212,2	4	12262	0,5506	0
1	265,3	4	12755	0,5527	0,00346
1,50	353,7	4	13021	0,5416	0,00897
1,75	370,4	4	12686	0,5453	0,01028
2	473,3	4	12640	0,5498	0,01692
2,125	546,8	4	12748	0,5550	0,02140
2,25	556,3	4	12531	0,5672	0,02237
2,5	954,9	4	11980	0,5979	0,04912
2,75	2478,2	4	9459	0,7606	0,16641
3	3991	4	7782	0,9682	0,28808
3,25	7237,2	4	4151	1,6108	0,58511
3,5	7876,6	4	3503,1	1,7563	0,64580

Svi uzorci sadržavali su 8 µl suspenzije liposoma. Oslobođeni kalcein (E) je vrijednost u intervalu 0-1, tako da je 0 početno stanje u kojem još nema izlaska kalceina iz liposoma, a 1 predstavlja izlazak svog kalceina iz liposoma.

Tablica 6c. Liposomi inkubirani 60 minuta u otopini natrijevog kolata

c (Na-kolat) [mM]	**B_f**	**τ_f**	**B_e**	**τ_e**	**Oslobođeni kalcein (E)**
0	212,2	4	12262	0,5507	0
1	259,7	4	12884	0,5452	0,00306
1,50	358,2	4	12981	0,5433	0,00929
1,75	398,6	4	12945	0,5424	0,01186
2	515,9	4	12853	0,5476	0,01931
2,125	628,6	4	12433	0,5616	0,02715
2,25	740,2	4	12374	0,5845	0,03434
2,5	2005,5	4	10204	0,7167	0,12775
2,75	4011	4	7398	1,0453	0,29967
3	5741	4	5575	1,3514	0,45248
3,25	7856,7	4	3491,6	1,9027	0,64595
3,5	8349,1	4	2927,4	1,955	0,69846

Svi uzorci sadržavali su 8 µl suspenzije liposoma. Oslobođeni kalcein (E) je vrijednost u intervalu 0-1, tako da je 0 početno stanje u kojem još nema izlaska kalceina iz liposoma, a 1 predstavlja izlazak svog kalceina iz liposoma.

Tablica 6d. Liposomi inkubirani 120 minuta u otopini natrijevog kolata

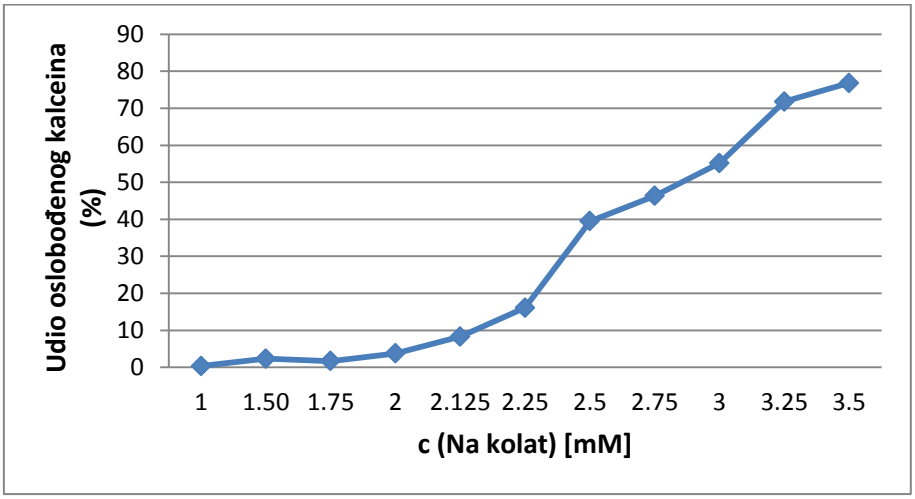
c (Na-kolat) [mM]	**B_f**	**τ_f**	**B_e**	**τ_e**	**Oslobođeni kalcein (E)**
0	212,2	4	12262	0,5507	0
1	262,8	4	12931	0,5437	0,00325
1,50	371,1	4	12726	0,5411	0,01030
1,75	442,8	4	13048	0,5494	0,01451
2	676,5	4	12664	0,5762	0,02965
2,125	1030,6	4	11975	0,6204	0,05388
2,25	1571,5	4	11102	0,6893	0,09258
2,5	4781	4	6901	1,1359	0,35555
2,75	5803	4	5751	1,4369	0,44755
3	6595,2	4	4793	1,6468	0,52602
3,25	8445,8	4	2968,9	2,0656	0,69798
3,5	8829,8	4	2406,1	2,0635	0,749036

Svi uzorci sadržavali su 8 µl suspenzije liposoma. Oslobođeni kalcein (E) je vrijednost u intervalu 0-1, tako da je 0 početno stanje u kojem još nema izlaska kalceina iz liposoma, a 1 predstavlja izlazak svog kalceina iz liposoma.

Tablica 6e. Liposomi inkubirani 180 minuta u otopini natrijevog kolata

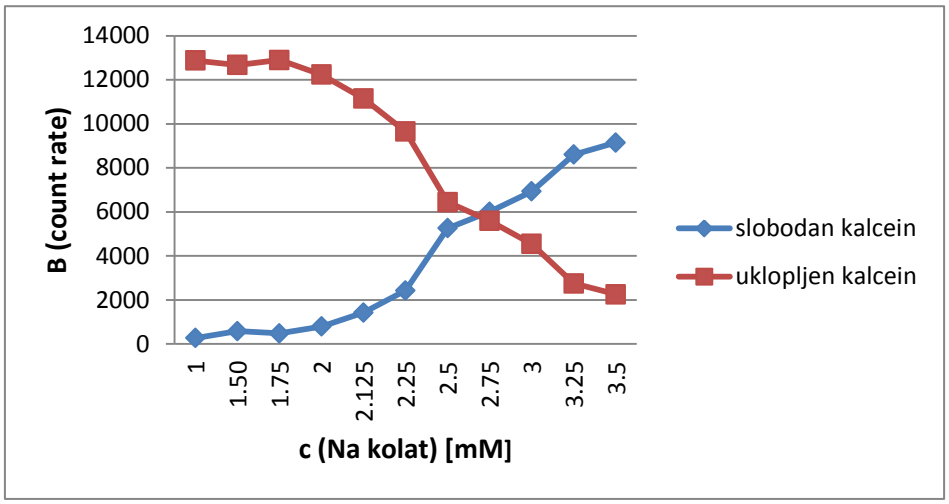
c (Na-kolat) [mM]	**B_f**	**τ_f**	**B_e**	**τ_e**	**Oslobođeni kalcein (E)**
0	212,2	4	12262	0,5507	0
1	267,2	4	12875	0,5431	0,00355
1,50	578,8	4	12675	0,5413	0,02356
1,75	481,8	4	12900	0,5578	0,01712
2	789,6	4	12237	0,6057	0,03783
2,125	1423,7	4	11148	0,6774	0,08304
2,25	2430,4	4	9646	0,8079	0,16082
2,5	5258,4	4	6442	1,1943	0,39496
2,75	6006,7	4	5592	1,5055	0,46338
3	6931,2	4	4545	1,7395	0,55196
3,25	8601,3	4	2748	2,0291	0,71783
3,5	9149	4	2251,2	2,0686	0,76788

Svi uzorci sadržavali su 8 µl suspenzije liposoma. Oslobođeni kalcein (E) je vrijednost u intervalu 0-1, tako da je 0 početno stanje u kojem još nema izlaska kalceina iz liposoma, a 1 predstavlja izlazak svog kalceina iz liposoma.



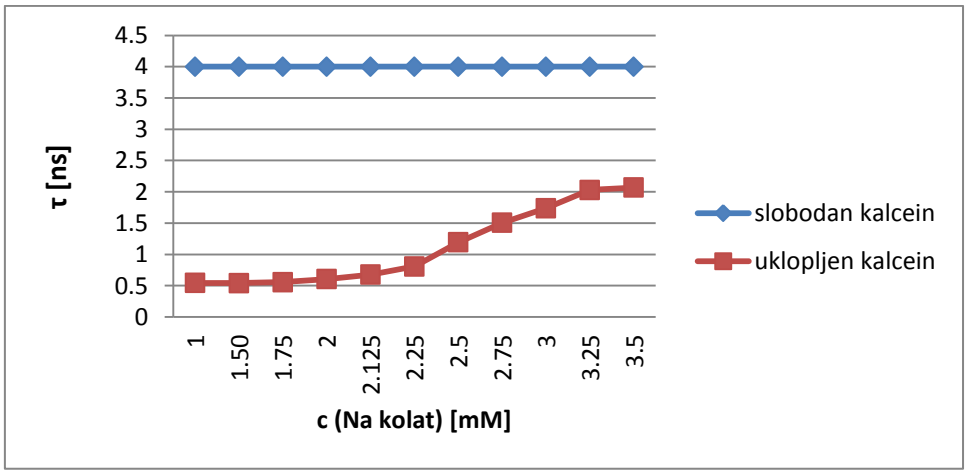
Slika 16. Ovisnost udjela oslobođenog kalceina (%) o koncentraciji natrijevog kolata nakon 180 minuta inkubacije.

Udio oslobođenog kalceina (%) je dobiven množenjem oslobođenog kalceina (E) sa 100.



Slika 17. Ovisnost preeksponencijalnih faktora (B) o koncentraciji natrijevog kolata nakon 180 minuta inkubacije.

Iz Slike 16 se jasno vidi da povećanjem koncentracije natrijevog kolata dolazi do povećanog izlaska uklopljenog kalceina iz liposoma (udio oslobođenog kalceina raste), a pri tome se naravno smanjuje udio kalceina koje ostaju u liposomima, što se vidi na Slici 17.

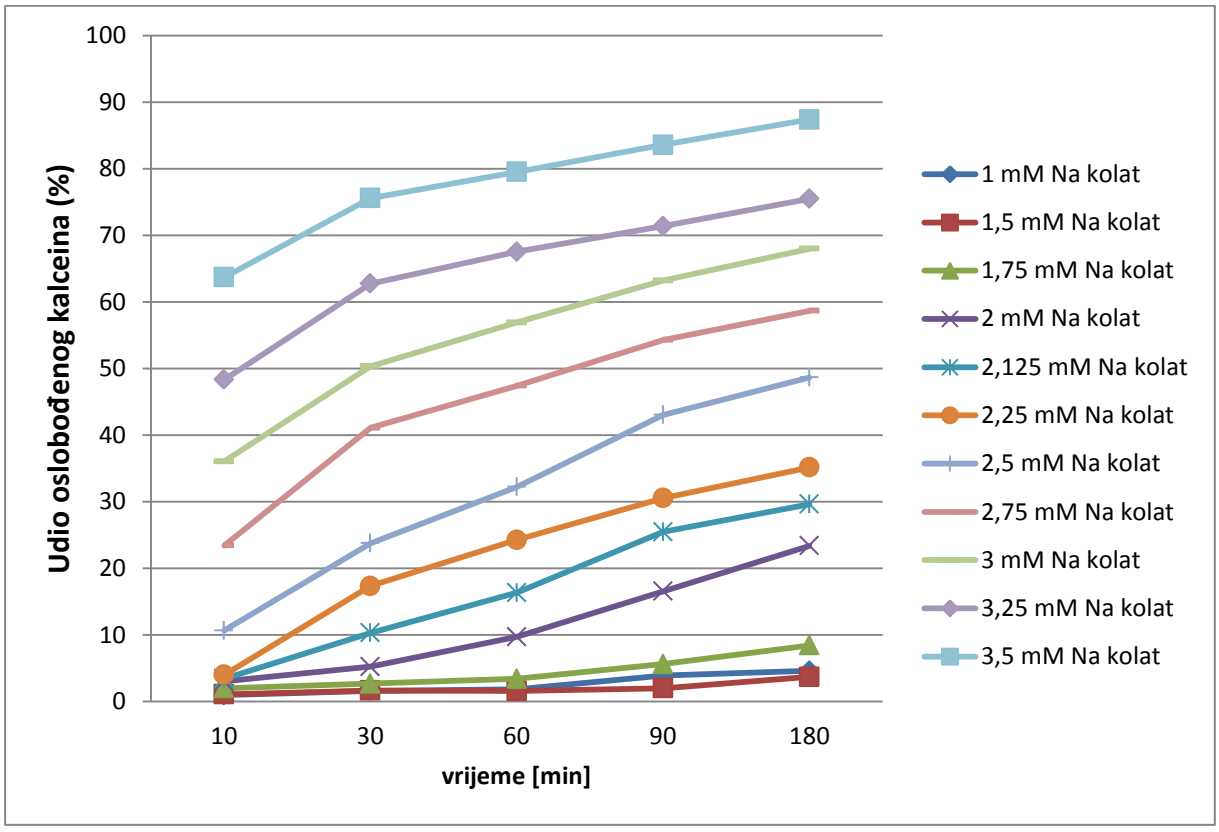


Slika 18. Ovisnost vremena života fluorescencije (τ) o koncentraciji Na-kolata nakon 180 minuta inkubacije

Slika 18 pokazuje porast vremena života fluorescencije kalceina unutar liposoma do čega dolazi zbog smanjenja svojstva samogašenja fluorescencije. Izlaskom molekula kalceina iz liposoma smanjuje se broj molekula kalceina unutar liposoma, tj. smanjuje se koncentracija kalceina u liposomu, što znači da pobuđene molekule kalceina imaju statistički manju vjerojatnost da naiđu na drugu molekulu kalceina i predaju joj energiju te tako potroše energiju koju bi inače otpustili fluorescencijom. S obzirom da statistički dolazi do rjeđih

sudara između pobuđenih molekula kalceina, vrijeme života fluorescencije molekula kalceina koje ostaju u liposomima (τ_e) se produžuje, jer treba dulje vrijeme da bi se ukupna fluorescencija zaostalog kalceina u jednom liposomu ugasila (Patel i sur. 2009.)

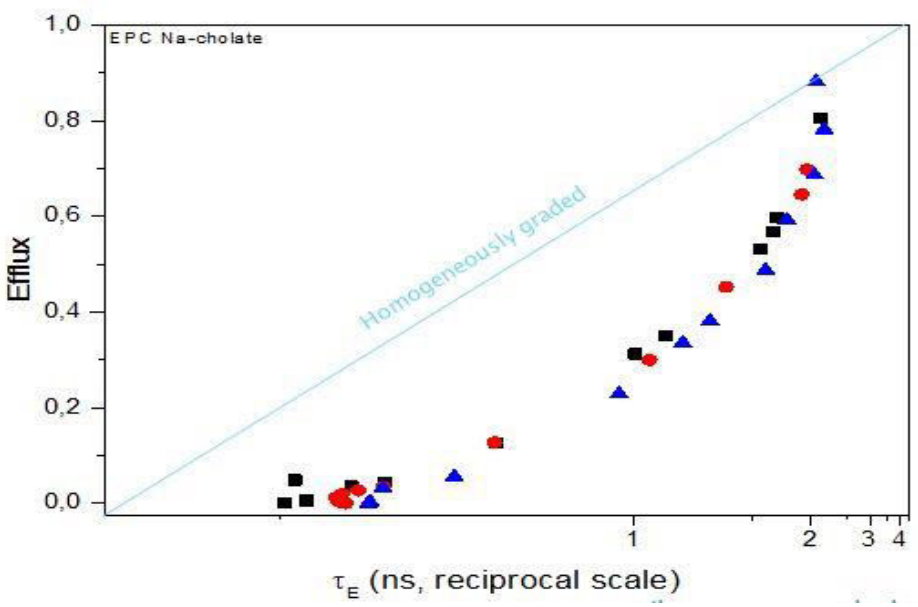
Stoga proizlazi da natrijev kolat uzrokuje postepeno otpuštanje iz liposomima, tzv. *graded leakage,* budući da dio molekula kalceina zaostaje u njima. Kod *all-or-none leakagea* imali bismo dvije vodoravne paralelne linije u grafu ovisnosti τ (vremenu života fluorescencije) o c (koncentraciji natrijevog kolata), s obzirom da kod takvog oblika oslobađanja kalceina, sav sadržaj liposoma izlazi van, ukoliko je njegova membrana oštećena. Molekule kalceina oslobođene iz liposoma imale bi $\tau = 4$ ns, jer se nalaze u relativno velikom volumenu pufera, dok bi kalcein u liposomima kod kojih nije došlo do oštećenja membrane ostao unutar liposoma i podlijegao procesu samogašenja fluorescencije te bi imao $\tau = 0{,}4$ ns.



Slika 19. Ovisnost udjela oslobođenog kalceina (%) o vremenu inkubacije liposoma u različitim koncentracijama natrijevog kolata. Udio oslobođenog kalceina (%) je dobiven množenjem oslobođenog kalceina (E) sa 100.

Na Slici 19. se vidi porast udjela oslobođenog kalceina iz liposoma povećanjem vremena inkubacije. Taj učinak je vrlo malen u ispitivanom vremenskom razdoblju (180

minuta) za koncentracije natrijevog kolata od 1,75 mM i manje jer se u tom vremenu oslobodi do 10 % sadržaja kalceina iz liposoma. Svojevrstan skok u brzom djelovanju natrijevog kolata na lipidne membrane liposoma vidljiv je već nakon 10 minuta pri koncentraciji od 2,5 mM i većoj, dok je udio oslobođenog kalceina pri nižim koncentracijama, u tom vremenskom periodu manji od 10%.



Slika 20. Ovisnost količine oslobođenog kalceina (*Efflux*) o vremenu života fluorescencije uklopljenog kalceina (τ_E)

Grafikon na Slici 20 prikazuje promjenu udjela kalceina otpuštenog iz liposoma (E, *efflux*) u ovisnosti o promjeni vremena života fluorescencije uklopljenog kalceina (τ_e) na semirecipročnoj skali za svaki od 3 niza mjerenja liposoma (kružići, kvadratići i trokutići). Za izradu grafa su korišteni podaci dobiveni nakon 180 min inkubacije liposoma s različitim koncentracijama natrijeva kolata (koncentracije Na-kolata prema Tablici 6e), budući da je kod njih najbolje razlučivanje vrijednosti oslobađanja (*efflu*x) i τ_E. Iz dobivene krivulje može se zaključiti da natrijev kolat uzrokuje tzv. *heterogenous graded leakage*, što znači da svi liposomi ne oslobađaju jednaku količinu kalceina, a računanjem vrijednosti E (*efflux*) prikazujemo prosječni postotak oslobođenog kalceina iz liposoma. U tzv. *homogenous graded leakeageu* imali bismo linearnu ovisnost *effluxa* o vremenu života fluorescencije zaostalog kalceina u liposomima pa bi povezivanjem točaka na grafu dobili pravac (kao što je prikazano na grafikonu) (Patel i sur. 2009).

Tablice 7a-e prikazuju dobivene preeksponencijalne faktore i vremena života fluorescencije kao i količinu oslobođenog kalceina u ovisnosti o koncentraciji natrijevog deoksikolata i vremenu inkubacije.

Slike 21, 22 i 23 prikazuju grafove ovisnosti promjene količine oslobođenog kalceina (E, *efflux*), promjene preeksponencijalnih faktora slobodnog (B_f) i uklopljenog kalceina (B_e), promjene vremena života fluorescencije slobodnog (τ_f) i uklopljenog kalceina (τ_e) o koncentraciji natrijevog deoksikolata s kojim su liposomi inkubirani, nakon 180 minuta.

Tablica 7a. Liposomi inkubirani 10 minuta u otopini natrijevog deoksikolata

C (Na deoksikolat) [mM]	**B_f**	**τ_f**	**B_e**	**τ_e**	**Oslobođeni kalcein (E)**
0	327,2	4	11849	0,5849	0
0,125	444,3	4	12405	0,5818	0,0078
0,25	512,9	4	12496	0,5741	0,01223
0,35	592,9	4	12570	0,5764	0,01731
0,5	839,3	4	12128	0,6052	0,03399
0,6	5448,9	4	5936	1,2773	0,41827
0,75	9634,4	4	1680,6	2,1360	0,82191

Svi uzorci sadržavali su 8 µl suspenzije liposoma. Oslobođeni kalcein (E) je vrijednost u intervalu 0-1, tako da je 0 početno stanje u kojem još nema izlaska kalceina iz liposoma, a 1 predstavlja izlazak svog kalceina iz liposoma.

Tablica 7b. Liposomi inkubirani 30 minuta u otopini natrijevog deoksikolata

C (Na deoksikolat) [mM]	**B_f**	**τ_f**	**B_e**	**τ_e**	**Oslobođeni kalcein (E)**
0	327,2	4	11849	0,5849	0
0,125	448,7	4	12474	0,5756	0,00805
0,25	508,7	4	12736	0,5703	0,01174
0,35	602	4	12785	0,5681	0,0176
0,5	3595,8	4	8902	0,7420	0,23429
0,6	6823,5	4	4581	1,6206	0,54165
0,75	10281,6	4	1113,6	2,19	0,88164

Svi uzorci sadržavali su 8 µl suspenzije liposoma. Oslobođeni kalcein (E) je vrijednost u intervalu 0-1, tako da je 0 početno stanje u kojem još nema izlaska kalceina iz liposoma, a 1 predstavlja izlazak svog kalceina iz liposoma.

Tablica 7c. Liposomi inkubirani 60 minuta u otopini natrijevog deoksikolata

c (Na deoksikolat) [mM]	**B_f**	**τ_f**	**B_e**	**τ_e**	**Oslobođeni kalcein (E)**
0	327,2	4	11849	0,5849	0
0,125	509,9	4	12914	0,5608	0,01165
0,25	530,2	4	12978	0,5549	0,01287
0,35	626,8	4	12985	0,5612	0,01886
0,5	4916,1	4	7046	1,0074	0,35180
0,6	8106,2	4	3362,3	1,8528	0,65847
0,75	10546,2	4	774,7	2,117	0,91661

Svi uzorci sadržavali su 8 µl suspenzije liposoma. Oslobođeni kalcein (E) je vrijednost u intervalu 0-1, tako da je 0 početno stanje u kojem još nema izlaska kalceina iz liposoma, a 1 predstavlja izlazak svog kalceina iz liposoma.

Tablica 7d. Liposomi inkubirani 120 minuta u otopini natrijevog deoksikolata

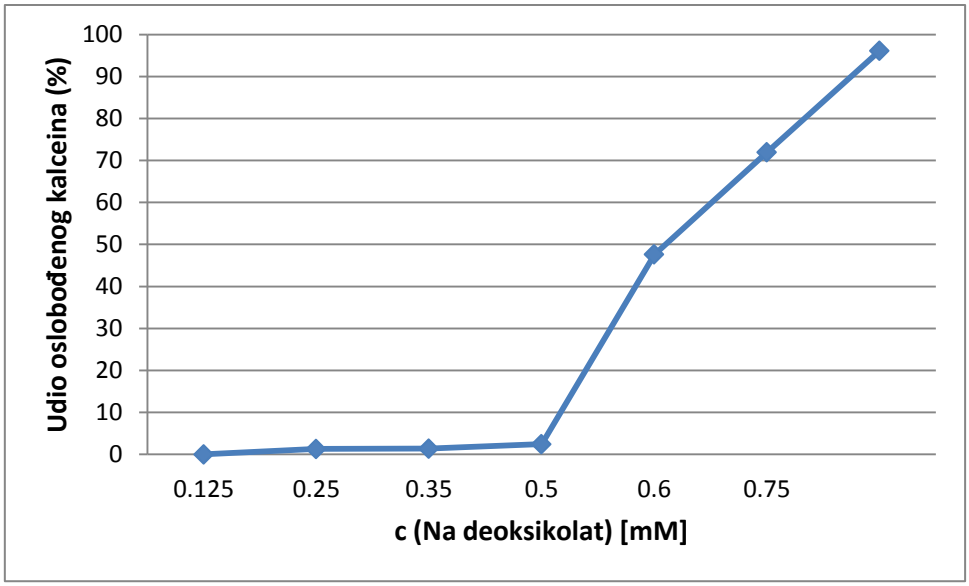
c (Na deoksikolat) [mM]	**B_f**	**τ_f**	**B_e**	**τ_e**	**Oslobođeni kalcein (E)**
0	327,2	4	11849	0,5849	0
0,125	530,4	4	12656	0,5568	0,01320
0,25	547,1	4	12733	0,5595	0,01419
0,35	654,9	4	12587	0,5685	0,02123
0,5	5751,2	4	5823	1,3089	0,43701
0,6	7075,2	4	2512,7	1,675	0,69116
0,75	8371,1	4	3028,9	1,9599	0,68877

Svi uzorci sadržavali su 8 µl suspenzije liposoma. Oslobođeni kalcein (E) je vrijednost u intervalu 0-1, tako da je 0 početno stanje u kojem još nema izlaska kalceina iz liposoma, a 1 predstavlja izlazak svog kalceina iz liposoma.

Tablica 7e. Liposomi inkubirani 180 minuta u otopini natrijevog deoksikolata

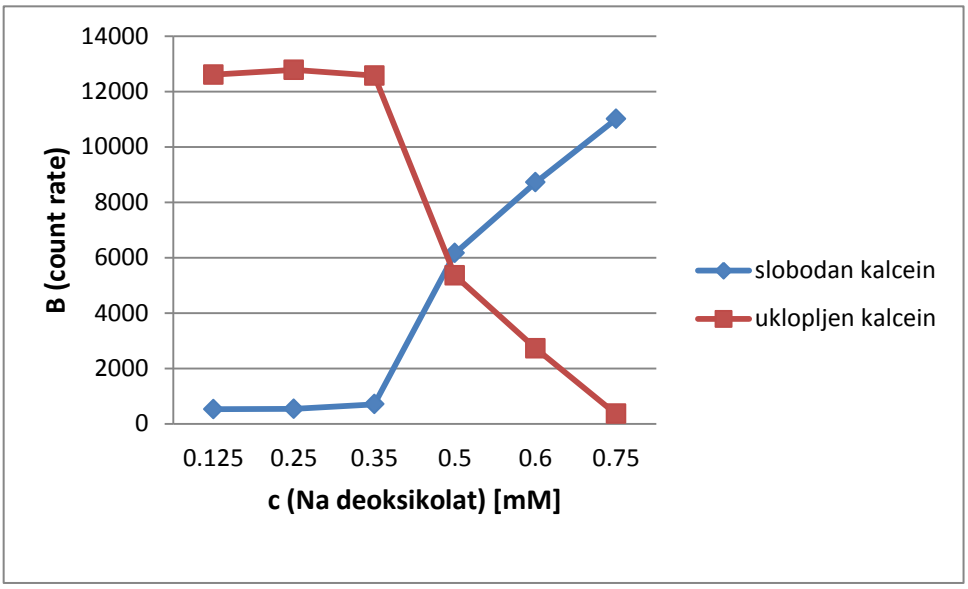
c(Na deoksikolat) [mM]	**B_f**	**τ_f**	**B_e**	**τ_e**	**Oslobođeni kalcein (E)**
0	327,2	4	11849	0,5849	0
0,125	525,3	4	12602	0,5603	0,01293
0,25	540,4	4	12778	0,5597	0,01371
0,35	704,8	4	12569	0,5762	0,02442
0,5	6162,9	4	5354	1,5219	0,47598
0,6	8715,1	4	2721,3	1,9608	0,71978
0,75	11003,3	4	360	1,518	0,96111

Svi uzorci sadržavali su 8 µl suspenzije liposoma. Oslobođeni kalcein (E) je vrijednost u intervalu 0-1, tako da je 0 početno stanje u kojem još nema izlaska kalceina iz liposoma, a 1 predstavlja izlazak svog kalceina iz liposoma.



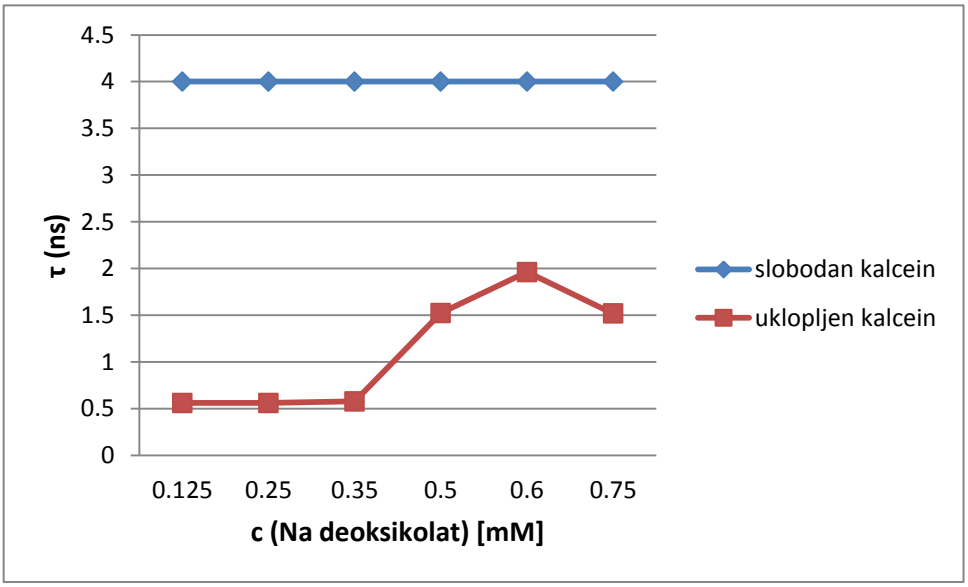
Slika 21. Ovisnost udjela oslobođenog kalceina (%) o koncentraciji natrijevog deoksikolata nakon 180 minuta inkubacije. Udio oslobođenog kalceina (%) je dobiven množenjem oslobođenog kalceina (E) sa 100.

Slika 21 pokazuje trend povećanog otpuštanja kalceina iz liposoma (*efflux*) porastom koncentracije natrijevog deoksikolata u kojem su lipsomi inkubirani.



Slika 22. Ovisnost preeksponencijalnih faktora (B) o koncentraciji natrijevog deoksikolata nakon 180 minuta inkubacije

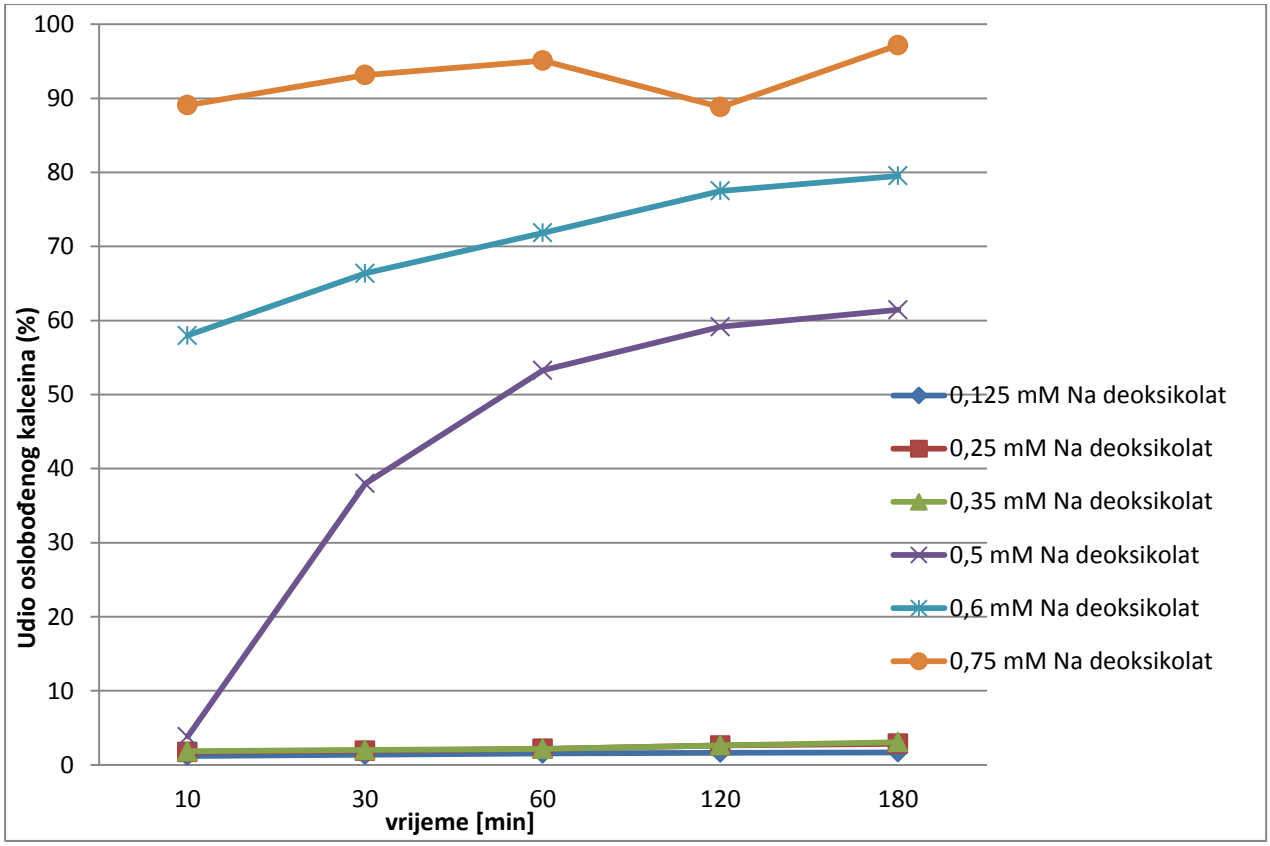
Porastom koncentracije natrijevog deoksikolata s kojim su liposomi inkubirani tijekom 180 minuta (Slika 22) dolazi do porasta slobodne frakcije kalceina i smanjenja uklopljene frakcije liposoma zbog učinka natrijevog deoksikolata na povećanu permeabilnost fosfolipidne membrane.



Slika 23. Ovisnost vremena života fluorescencije kalceina (τ) o koncentraciji natrijevog deoksikolata nakon 180 minuta inkubacije

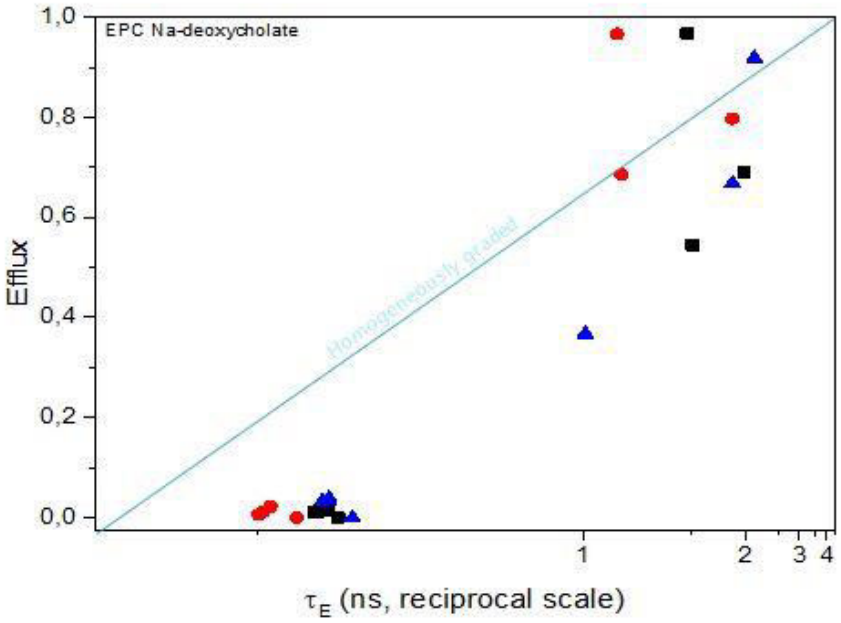
Slika 23 pokazuje porast vremena života fluorescencije kalceina unutar liposoma s porastom koncentracije otopine natrijeva deoksikolata u kojoj su liposomi inkubirani. Do toga dolazi zbog sve većeg izlaska kalceina iz liposoma i posljedičnog smanjenja koncentracije kalceina u liposomima pa se učinak samogašenja fluorescencije (*self-quenching*) smanjuje što se očituje porastom vrijednosti izmjerene fluorescencije.

Također, kao i kod uzoraka liposoma s natrijevim kolatom, i ovdje je prisutan trend postepenog otpuštanja kalceina iz liposoma tzv. *graded leakage*, što znači da dio molekula kalceina zaostaje u liposomima.



Slika 24. Ovisnost udjela oslobođenog kalceina o vremenu inkubacije liposoma s različitim koncentracijama natrijevog deoksikolata. Udio oslobođenog kalceina (%) je dobiven množenjem oslobođenog kalceina (E) sa 100.

Slikom 24 je pokazano da se produživanjem vremena inkubacije povećava udio oslobođenog kalceina iz liposoma, iako je taj učinak zanemariv za koncentracije natrijevog deoksikolata manje od 0,5 mM u ispitivanom vremenskom razdoblju (180 minuta). Pri koncentraciji natrijevog deoksikolata od 0,6 mM i većoj, dolazi do naglog izlaska uklopljenog kalceina iz liposoma te je već nakon 10 minuta inkubacije udio oslobođenog kalceina bio veći od 50%.



Slika 25. Ovisnost količine oslobođenog kalceina (E, *efflux*) o vremenu života fluorescencije uklopljenog kalceina (τ_E)

Grafikon na Slici 25 prikazuje promjenu količine kalceina oslobođenog iz liposoma (E, *efflux*) u ovisnosti o promjeni vremena života fluorescencije uklopljenog kalceina (τ_e) na semirecipročnoj skali za svaki od 3 niza mjerenja liposoma (kružići, kvadratići i trokutići). Za izradu grafa su korišteni podaci dobiveni nakon 180 min inkubacije liposoma s različitim koncentracijama natrijeva deoksikolata (koncentracije Na deoksikolata prema Tablici 7e), budući da je kod njih najbolje razlučivanje vrijednosti oslobađanja (*efflux*) i τ_E. Dobivena krivulja je dosta nejasna, tako da se ne može sa sigurnošću reći koja podskupina *graded leakagea* je prisutna.

Tablice 8a-e prikazuju preeksponencijalne faktore i vremena života fluorescencije kao i količinu oslobođenog kalceina u ovisnosti o koncentraciji natrijeva taurokolata i vremenu inkubacije.

Slike 26, 27 i 28 prikazuju grafove ovisnosti promjene količine oslobođenog kalceina (E, *efflux*), promjene preeksponencijalnih faktora slobodnog (B_f) i uklopljenog kalceina (B_e), promjene vremena života fluorescencije slobodnog (τ_f) i uklopljenog kalceina (τ_e) o koncentraciji natrijevog taurokolata u kojem su liposomi inkubirani tijekom 180 minuta.

Tablica 8a. Liposomi inkubirani 10 minuta u otopini natrijevog taurokolata

c (Na taurokolat) mM]	**B_f**	**τ_f**	**B_e**	**τ_e**	**Oslobođeni kalcein (E)**
0	327,2	4	11849	0,5849	0
0,25	327,5	4	11766	0,5903	0
0,5	419	4	11975	0,5985	0,00634
1	1421,3	4	10634	0,7257	0,07897
1,125	3369,4	4	8262	0,9968	0,23480
1,25	3612	4	7747	1,0306	0,26109
1,5	6482,7	4	4885	1,5340	0,51221
1,75	7903,4	4	3514	1,8185	0,64243
2	9806,1	4	1451,2	2,27	0,84480

Svi uzorci sadržavali su 8 µl suspenzije liposoma. Oslobođeni kalcein (E) je vrijednost u intervalu 0-1, tako da je 0 početno stanje u kojem još nema izlaska kalceina iz liposoma, a 1 predstavlja izlazak svog kalceina iz liposoma.

Tablica 8b. Liposomi inkubirani 30 minuta u otopini natrijevog taurokolata

c (Na taurokolat) [mM]	**B_f**	**τ_f**	**B_e**	**τ_e**	**Oslobođeni kalcein (E)**
0	327,2	4	11849	0,58486	0
0,25	348,8	4	12024	0,58782	0,001494768
0,5	454,3	4	11993	0,60973	0,008754227
1	3575,1	4	8263	10.293	0,246735291
1,125	4783,5	4	6880	1,2116	0,350550254
1,25	5290	4	6109	1,3278	0,403689725
1,5	7010,8	4	4472,1	1,6953	0,554650078
1,75	8555	4	2866	2,0626	0,705219851
2	10373,5	4	981,2	2,084	0,895093792

Svi uzorci sadržavali su 8 µl suspenzije liposoma. Oslobođeni kalcein (E) je vrijednost u intervalu 0-1, tako da je 0 početno stanje u kojem još nema izlaska kalceina iz liposoma, a 1 predstavlja izlazak svog kalceina iz liposoma.

Tablica 8c.Liposomi inkubirani 60 minuta u otopini natrijevog taurokolata

c (Na taurokolat) [mM]	**Bf**	**τf**	**Be**	**τe**	**Oslobođeni kalcein (E)**
0	327,2	4	11849	0,5849	0
0,25	348,6	4	12276	0,5891	0,00145
0,5	468,3	4	12244	0,5998	0,00951
1	4063,2	4	7471	1,1158	0,29415
1,125	5112,8	4	6657	1,2392	0,37464
1,25	5599,6	4	5955	1,3759	0,42456
1,5	7267,2	4	4283,3	1,7724	0,57450
1,75	9028,4	4	2359,9	2,0418	0,75446
2	10626	4	711,8	1,913	0,92341

Svi uzorci sadržavali su 8 µl suspenzije liposoma. Oslobođeni kalcein (E) je vrijednost u intervalu 0-1, tako da je 0 početno stanje u kojem još nema izlaska kalceina iz liposoma, a 1 predstavlja izlazak svog kalceina iz liposoma.

Tablica 8d. Liposomi inkubirani 120 minuta u otopini natrijevog taurokolata

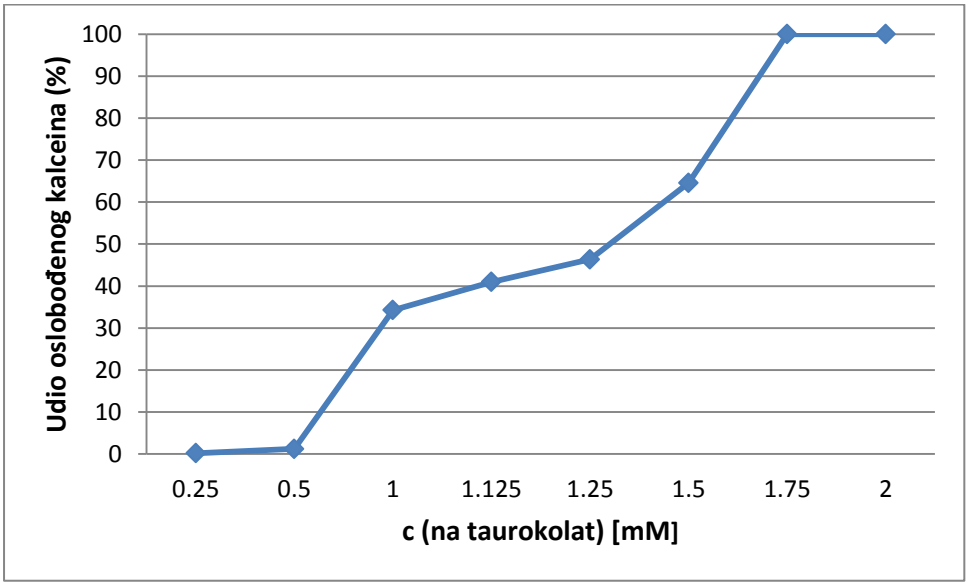
c (Na taurokolat) [mM]	**Bf**	**τf**	**Be**	**τe**	**Oslobođeni kalcein (E)**
0	327,2	4	11849	0,5849	0
0,25	349,2	4	12216	0,5902	0,00150
0,5	492,5	4	12444	0,5964	0,01095
1	4432,9	4	7073	1,1698	0,32602
1,125	5279,5	4	6346	1,3181	0,39406
1,25	5763,2	4	5712	1,4165	0,44230
1,5	7481,6	4	3810,7	1,8195	0,61007
1,75	9369,1	4	1895,6	2,1596	0,79899
2	10967,6	4	407,7	1,819	0,95604

Svi uzorci sadržavali su 8 µl suspenzije liposoma. Oslobođeni kalcein (E) je vrijednost u intervalu 0-1, tako da je 0 početno stanje u kojem još nema izlaska kalceina iz liposoma, a 1 predstavlja izlazak svog kalceina iz liposoma.

Tablica 8e. Liposomi inkubirani 180 minuta u otopini natrijevog taurokolata

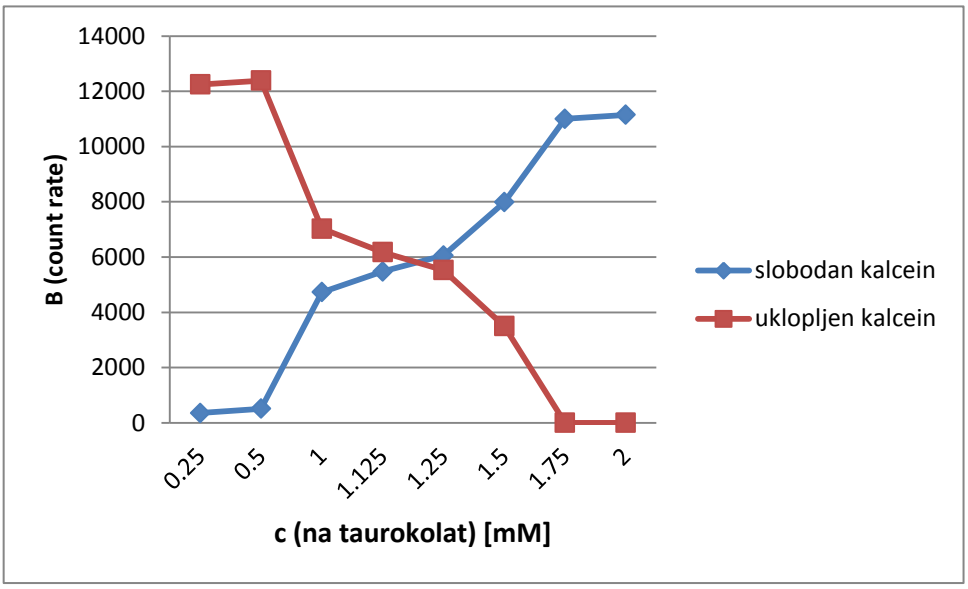
c (Na taurokolat) [mM]	Bf	τf	Be	τe	Oslobođeni kalcein (E)
0	327,2	4	11849	0,5849	0
0,25	353,6	4	12249	0,5777	0,00179
0,5	513,3	4	12385	0,5916	0,01236
1	4727,2	4	7029	1,184	0,34282
1,125	5477,5	4	6178	1,3254	0,40993
1,25	6055,2	4	5526	1,4483	0,46346
1,5	7986,7	4	3499,1	1,8584	0,64591
1,75	11002,6	4	0	0,0000	1
2	11147,1	4	0	0,0000	1

Svi uzorci sadržavali su 8 µl suspenzije liposoma. Oslobođeni kalcein (E) je vrijednost u intervalu 0-1, tako da je 0 početno stanje u kojem još nema izlaska kalceina iz liposoma, a 1 predstavlja izlazak svog kalceina iz liposoma.



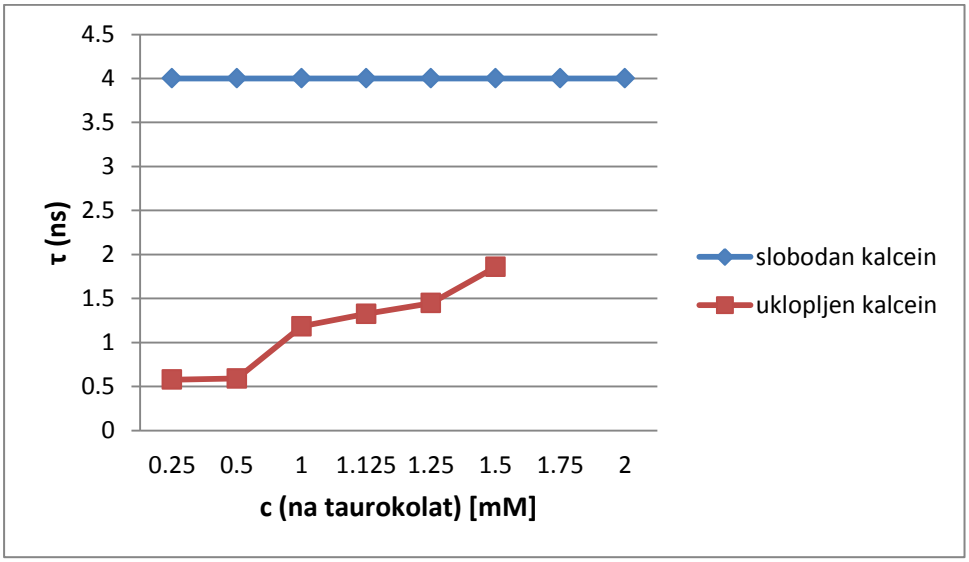
Slika 26. Ovisnost udjela oslobođenog kalceina o koncentraciji natrijevog taurokolata nakon 180 minuta inkubacije. Udio oslobođenog kalceina (%) je dobiven množenjem oslobođenog kalceina (E) sa 100.

Iz Slike 26 je vidljivo da porastom koncentracije natrijevog taurokolata dolazi do povećanog izlaska kalceina iz liposoma, što se očituje povećanjem *effluxa (E)*. Za razliku od ostalih žučnih soli, u ispitivanju s taurokolatom postignut je 100%-ni izlazak kalceina iz liposoma nakon 3 sata inkubacije.



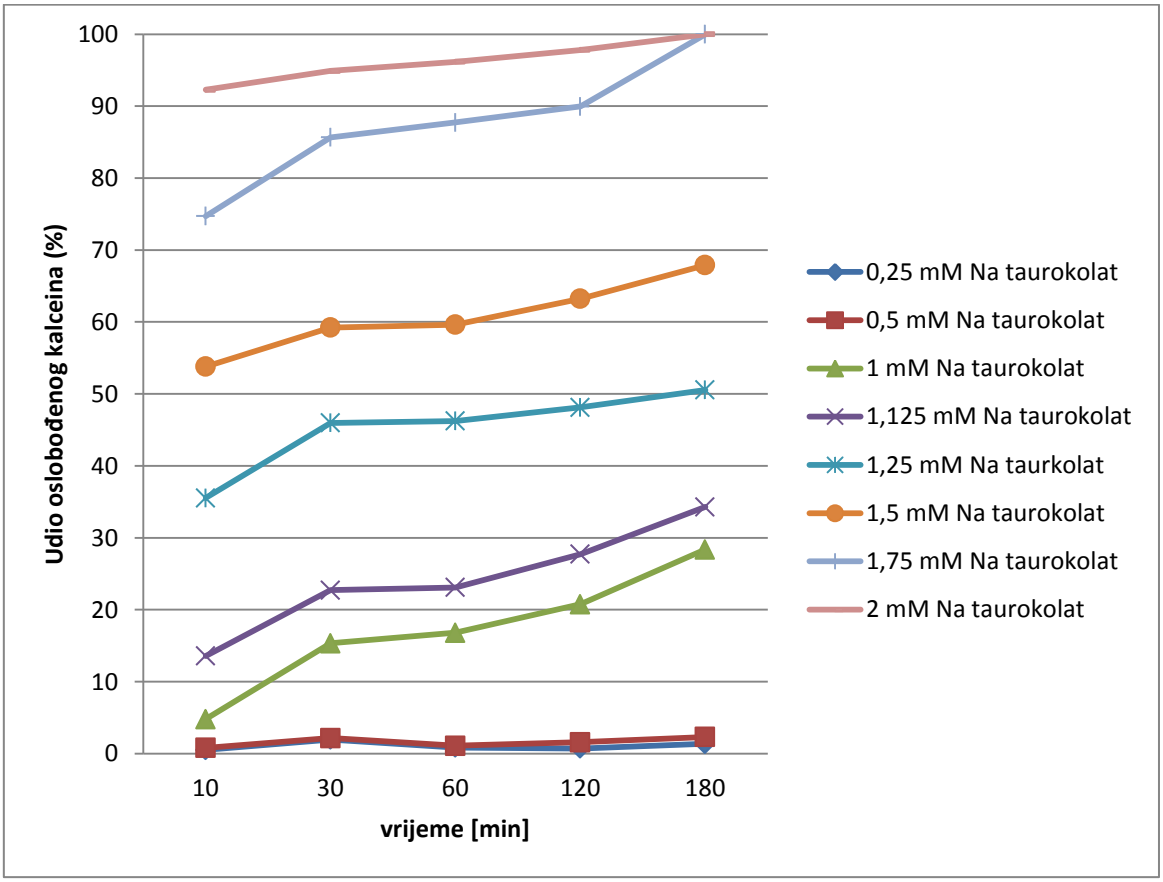
Slika 27. Ovisnost preeksponencijalnih faktora (B) o koncentraciji natrijevog taurokolata nakon 180 minuta inkubacije

Slikom 27 je prikazano smanjenje frakcije liposomski uklopljenog kalceina, uz istovremeni porast slobodne frakcije (oslobođeni kalcein).



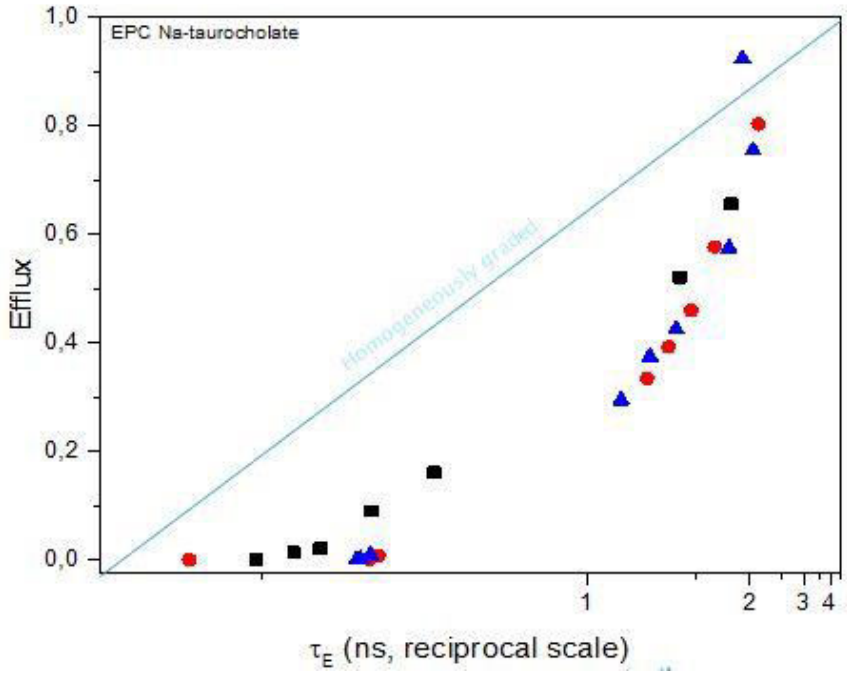
Slika 28. Ovisnost vremena života fluorescencije (τ) o koncentraciji Na taurokolata nakon 180 min inkubacije

Slika 28 pokazuje porast vremena života fluorescencije kalceina unutar liposoma s porastom koncentracije otopine natrijevog taurokolata u kojoj su liposomi inkubirani. Do toga dolazi zbog sve većeg izlaska kalceina iz liposoma i posljedičnog smanjenja koncentracije kalceina u liposomima pa se učinak samogašenja fluorescencije (*self-quenching*) smanjuje što se očituje porastom vrijednosti izmjerene fluorescencije. Također, kao i kod ispitivanja provednih s natrijevim kolatom i deoksikolatom, i ovdje je prisutan tzv. *graded leakage*.



Slika 29.Ovisnost udjela oslobođenog kalceina o vremenu inkubacije liposoma u različitim koncentracijama natrijevog taurokolata. Udio oslobođenog kalceina (%) je dobiven množenjem oslobođenog kalceina (E) sa 100.

Slikom 29 je pokazano da se produživanjem vremena inkubacije povećava udio oslobođenog kalceina iz liposoma, iako je taj učinak zanemariv za koncentracije natrijevog taurokolata manje od 0,5 mM u ispitivanom vremenskom razdoblju (180 minuta). Također se može primjetiti da vrijeme inkubacije slabije utječe na udio oslobođenog kalceina (E, *efflux*) nego što je to bio slučaj u ispitivanju s natrijevim kolatom i deoksikolatom (Slike 19 i 24) do čega vjerojatno dolazi zbog razlike u strukturi molekula ispitivanih žučnih soli (Slike 10-12).



Slika 30. Ovisnost količine oslobođenog kalceina (E, *efflux*) o vremenu života uklopljenog kalceina (τ_E)

Grafikon na Slici 30 prikazuje promjenu udjela kalceina oslobođenog iz liposoma (E, *efflux*) u ovisnosti o promjeni vremena života fluorescencije uklopljenog kalceina (τ_e) na semirecipročnoj skali za svaki od 3 niza mjerenja liposoma (kružići, kvadratići i trokutići). Za izradu grafa su korišteni podaci dobiveni nakon 180 min inkubacije liposoma s različitim koncentracijama natrijeva taurokolata (koncentracije natrijevog taurokolata prema Tablici 8e), budući da je kod njih najbolje razlučivanje vrijednosti E i τ_E. Iz dobivene krivulje može se zaključiti da natrijev taurokolat uzrokuje heterogeni *graded leakage*, što znači da svi liposomi ne oslobađaju jednaku količinu kalceina. Računanjem vrijednosti E dobiva se prosječni postotak oslobođenog kalceina iz liposoma. U homogenom *graded leakeageu* postojala bi linearna ovisnost *effluxa* o vremenu života fluorescencije zaostalog kalceina u liposomima pa bi povezivanjem točaka na grafu dobili pravac.

Koncentracija žučne soli potrebna da izazove oslobađanje uklopljenog sadržaja iz liposoma utjecajem na integritet fosfolipidne membrane ovisi o strukturi same žučne soli. Pokazalo se da natrijev deoksikolat ima najveći potencijal mijenjanja permeabilnosti fosfolipidnog dvosloja, zbog svoje molekulske strukture koja uključuje 2 –OH skupine, a koje mu omogućuju bolje interkaliranje u membranu liposoma. Za razliku od njega, natrijev kolat i taurokolat imaju 3 slobodne –OH skupine (Slike 10-12).

Natrijev deoksikolat već u maloj koncentraciji, od 0,5 mM, uzrokuje značajno oslobađanje uklopljenog sadržaja nakon samo 10 minuta inkubacije žučne soli s liposomima. Stoga se može zaključiti da povećanjem lipofilnosti žučne soli (smanjenjem broja slobodnih –OH skupina) dolazi do boljeg interkaliranja u membranu što povećava njezinu propusnost za uklopljenu hidrofilnu suspstanciju.

5. ZAKLJUČCI

Temeljem svih provedenih ispitivanja i obradom dobivenih rezultata, iz ovog je istraživanja moguće izvesti sljedeće zaključke:

- Sve korištene otopine žučnih soli (natrijev kolat, deoksiklat i taurokolat), pri određenim (kritičnim) minimalnim koncentracijama, povećavaju permeabilnost fosfolipidnih dvoslojeva liposoma uzrokujući oslobađanje uklopljenog sadržaja (hidrofilni fluorescentni marker). Kod niskih koncentracija žučnih soli (< 0.5 mM), učinak na permeabilnost membrane je veoma slab i rezultira zanemarivo malim udjelom oslobođene uklopljene hidrofilne tvari iz liposoma.
- Udio oslobođenog kalceina raste s povećanjem koncentracije žučne soli i duljim vremenom inkubacije liposoma sa žučnim solima. Međutim, s koncentracijama žučnih soli nižim od određene kritične minimalne koncentracije nije moguće postići značajnije oslobađanje uklopljenog sadržaja, bez obzira koliko dugo je uzorak inkubiran.
- Sve tri vrste žučnih soli uzrokovale su tzv. *graded leakage*, tj. postepeno oslobađanje kalceina iz liposoma. Otopine natrijevog kolata i taurokolata rezultirale su heterogenim tipom postepenog oslobađanja (*heterogenous graded leakage*), dok se za natrijev deoksikolat nije moglo zaključiti koju podvrstu *graded leakagea* uzrokuje.
- Koncentracija žučne soli potrebna da izazove oslobađanje uklopljenog sadržaja iz liposoma utjecajem na integritet fosfolipidne membrane ovisi o strukturi same žučne soli (prisutnim –OH skupinama). Najveći potencijal mijenjanja permeabilnosti fosfolipidnog dvosloja liposoma već u koncentraciji od 0,5 mM pokazao je natrijev deoksikolat (2 –OH skupine).
- Bilo bi poželjno provesti dodatna ispitivanja s drugim žučnim solima, veće i manje lipofilnosti od ovih istraživanih u ovom radu, kako bi se potvrdio učinak strukture žučne soli na permeabilnost liposoma.
- Potrebno je također provesti dodatna ispitivanja s liposomima kompleksnijeg sastava lipidnog dvosloja nego je ovaj korišteni u ovom radu (fosfatidilkolin) kako bi se utvrdio utjecaj žučnih soli na parametar rigidnosti/elastičnosti lipidne membrane.

6. LITERATURA

Belhocine ZT, Prato FS. Transbilayer phospholipids molecular imaging. *EJNMMI Research*, 2011, 1:17

Dynamic light scattering: Measuring the particle size distribution, 2017., http://www.lsinstruments.ch pristupljeno 10. 07. 2017.

Grabielle-Madelmont C, Lesieur S, Ollivon M. Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography. *J Biochem Biophys Methods56*, 2003, 189–217.

Hall J. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology.13. izdanje. Philadelphia, Saunders, 2015, str. 784-785.

Kalie L. Einfluss des Serum-Komplementsystems auf die Permeabilität von Liposomenmembranen. Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaftender Albert-Ludwigs-Universitätzu Freiburg im Breisgau, Freiburg, 2006, str. 1-2, 5, 9-11.

Ladokhin AS, WimleyWC, White SH. Leakage of membrane vesicle contents: determination of mechanism using fluorescence requenching. *Biophy J,* 1995, 69, 1964–1971.

Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York, Springer, 2010, str. 1-9.

Lasic DD. Liposomes: from physics to applications. Amsterdam; New York, Elesiver, 1993, str. 3-6, 15-19.

Lopes SCA, Giuberti CS, Rocha TGR, Ferreira DS, Leite EA, Olivieira MC. Liposomes as carriers of anticancer drugs. U: Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches, Rangel R, urednik, *InTech*, 2013, 85-124.

Patel H, Huynh Q, Bärlehner D, Heerklotz H. Additive and Synergistic Membrane Permeabilization by Antimicrobial (Lipo)Peptides and Detergents. *Biophys J*, 2014, Volume 106.

Patel H, Tscheka C, Heerklotz H. Characterizing vesicle leakage by fluorescence lifetime measurements. *Soft Matter*, 2009,5, 2849–2851.

Patel H, Tscheka C, Edwards K, Karlsson G, Heerklotz H. All-or-none membrane permeabilization by fengycin-type lipopeptides from Bacillus subtilis QST713. *BBA*, 2011,1808, 2000–2008.

Schubert R, Jaroni H, Schoelmerich J, Schmidt KH. Studies on the Mechanism of Bile Salt-Induced Liposomal Membrane Damage. *Digestion,* 1983, 28, 181-190.

Time-resolved fluorescence, www.picoquant.com, pristupljeno: 11.07.2017.

Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: strukturna svojstva i klasifikacija. *Farm glas,* 2012a, 68, 391-400.

Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: metode priprave. *Farm glas,* 2012b, 68, 457-466.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj žučnih soli na permeabilnost fosfolipidnog dvosloja liposoma i oslobađanje uklopljene hidrofilne tvari. Liposomi s kalceinom (hidrofilni fluorescentni marker) pripremljeni su metodom hidratacije suhog fosfolipidnog sloja korištenjem fosfatidilkolina kao jedine lipidne komponente. Homogenizacija liposomskih disperzija provedena je ekstruzijom kroz polikarbonatne membrane veličine pora 400 nm i 100 nm. Odjeljivanje neuklopljenog kalceina provedeno je gel kromatografijom, a konačna koncentracija fosfolipida u ekstrudiranoj liposomskoj disperziji je određena Bartlett-ovom metodom. Ispitivanja utjecaja žučnih soli na mehanizam oslobađanja uklopljenog sadržaja iz liposoma provedena su tako da su liposomi s uklopljenim kalceinom inkubirani kroz dulji vremenski period u otopinama natrijevog kolata, deoksikolata ili taurokolata različitih koncentracija. U određenim vremenskim intervalima svakom je uzorku izmjereno vrijeme života slobodnog i uklopljenog kalceina korištenjem metode vremenski koreliranog pojedinačnog brojanja fotona (eng. *time-correlated single photon counting*, TCSPC). Dobiveni podatci su matematički obrađeni te je izračunata količina oslobođenog kalceina.

Ekstruzija originalno pripravljenih liposoma film metodom je rezultirala homogenom disperzijom unilamelarnih liposoma srednjeg promjera od 141 nm i malog indeksa polidisperznosti (0,062). Sve ispitivane žučne soli imale su utjecaj na integritet liposomske mebrane što se očitovalo povećanjem permeabilnosti uklopljenog sadržaja iz liposoma (kalcein). Sve korištene otopine žučnih soli uzrokovale su postepeno otpuštanje kalceina iz liposoma (eng. *graded leakage)*, pri čemu je za natrijev kolat i taurokolat potvrđeno da uzrokuju podvrstu heterogenog postepenog oslobađanja (*heterogenous graded leakage*) dok za natrijev deoksikolat to nije bilo moguće sa sigurnoću odrediti. Natrijev deoksikolat je imao najjači učinak na povećanje permeabilnosti fosfolipidnog dvosloja liposoma već u koncentraciji od 0,5 mM. Kod svih ispitivanih otopina žučnih soli dokazano je da porastom koncentracije žučne soli i duljim vremenom inkubacije raste udio oslobođenog kalceina. Međutim, pri koncentracijama žučnih soli nižim od određene kritične minimalne koncentracije nije bilo moguće postići značajnije oslobađanje uklopljenog sadržaja, bez obzira na produljenje vremena inkubacije.

The object of this research was to study the liposomal leakage in phospholipid bilayers caused by bile salts. For that purpose, calcein-loaded phosphatidylcholine liposomes were made using the thin layer method. Calcein was used, because it was the most suitable hydrophilic dye for this research. In order to get a more homogenous fraction, liposomes were extruded through 400 nm and 100 nm polycarbonate membranes. The surplus of free calcein was removed from the calcein-loaded liposomal solution by size exclusion chromatography (SEC). Because this method diluted the sample, the phospholipid concentration of the liposomal sample was determined by Bartlett method. The leakage assay of calcein-loaded liposomes was done by incubating the liposomes in solutions of sodium cholate, sodium taurocholate and sodium deoxycholate of different concentrations during a longer period of time. At pre-determined time intervals, fluorescence lifetime of the free and entrapped calcein molecules was measured using the time correlated single photon counting method (TCSPC). The results were then analyzed by biexponential curve fitting and the efflux of calcein molecules was determined for each bile salt concentration and incubation time.

The previously done liposomal extrusion resulted in a homogenous fraction of unilamellar liposomes (polydispersity index 0.062) that had an average diameter of 141 nm. All of the bile salts used had an effect on the permeability of liposomal membrane, causing it to leak the entrapped calcein. More precisely, all the bile salts induced graded leakage in phosphatidlycholine liposomes. While sodium cholate and taurocholate caused heterogeneously graded leakage, the exact subgroup of graded leakage could not be determined for sodium deoxycholate. However, sodium deoxycholate had the strongest effect on liposomal membranes, causing them to leak calcein at a very low concentration of 0.5 mM. It has been found that by increasing the bile salt concentration and prolonging the incubation time, one can achieve greater leakage of the entrapped dye. Although this is only true for bile salt concentrations that exceed a specific minimal concentration needed to cause distortions in liposomal bilayers.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Utjecaj žučnih soli na permeabilnost liposoma i mehanizam oslobađanja kalceina

Ivan Cvetković

SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj žučnih soli na permeabilnost fosfolipidnog dvosloja liposoma i oslobađanje uklopljene hidrofilne tvari. Liposomi s kalceinom (hidrofilni fluorescentni marker) pripremljeni su metodom hidratacije suhog fosfolipidnog sloja korištenjem fosfatidilkolina kao jedine lipidne komponente. Homogenizacija liposomskih disperzija provedena je ekstruzijom kroz polikarbonatne membrane veličine pora 400 nm i 100 nm. Odjeljivanje neuklopljenog kalceina provedeno je gel kromatografijom, a konačna koncentracija fosfolipida u ekstrudiranoj liposomskoj disperziji je određena Bartlett-ovom metodom. Ispitivanja utjecaja žučnih soli na mehanizam oslobađanja uklopljenog sadržaja iz liposoma provedena su tako da su liposomi s uklopljenim kalceinom inkubirani kroz dulji vremenski period u otopinama natrijevog kolata, deoksikolata ili taurokolata različitih koncentracija. U određenim vremenskim intervalima svakom je uzorku izmjereno vrijeme života slobodnog i uklopljenog kalceina korištenjem metode vremenski koreliranog pojedinačnog brojanja fotona (eng. *time-correlated single photon counting*, TCSPC). Dobiveni podatci su matematički obrađeni te je izračunata količina oslobođenog kalceina.

Ekstruzija originalno pripravljenih liposoma film metodom je rezultirala homogenom disperzijom unilamelarnih liposoma srednjeg promjera od 141 nm i malog indeksa polidisperznosti (0,062). Sve ispitivane žučne soli imale su utjecaj na integritet liposomske mebrane što se očitovalo povećanjem permeabilnosti uklopljenog sadržaja iz liposoma (kalcein). Sve korištene otopine žučnih soli uzrokovale su postepeno otpuštanje kalceina iz liposoma (eng. *graded leakage)*, pri čemu je za natrijev kolat i taurokolat potvrđeno da uzrokuju podvrstu heterogenog postepenog oslobađanja (*heterogenous graded leakage*) dok za natrijev deoksikolat to nije bilo moguće sa sigurnoću odrediti. Natrijev deoksikolat je imao najjači učinak na povećanje permeabilnosti fosfolipidnog dvosloja liposoma već u koncentraciji od 0,5 mM. Kod svih ispitivanih otopina žučnih soli dokazano je da porastom koncentracije žučne soli i duljim vremenom inkubacije raste udio oslobođenog kalceina. Međutim, pri koncentracijama žučnih soli nižim od određene kritične minimalne koncentracije nije bilo moguće postići značajnije oslobađanje uklopljenog sadržaja, bez obzira na produljenje vremena inkubacije.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 51 stranicu, 30 grafičkih prikaza, 20 tablica i 16 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Fosfatidilkolin liposomi, oslobađanje uklopljenog sadržaja, žučne soli, vrijeme života fluorescencije, vremenski ovisno pojedinačno brojanje fotona

Mentor: **Dr. sc. Željka Vanić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Željka Vanić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Ivan Pepić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical technology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

The effect of bile salts on liposomal permeability and calcein's leakage mechanism

Ivan Cvetković

SUMMARY

The object of this research was to study the liposomal leakage in phospholipid bilayers caused by bile salts. For that purpose, calcein-loaded phosphatidylcholine liposomes were made using the thin layer method. Calcein was used, because it was the most suitable hydrophilic dye for this research. In order to get a more homogenous fraction, liposomes were extruded through 400 nm and 100 nm polycarbonate membranes. The surplus of free calcein was removed from the calcein-loaded liposomal solution by size exclusion chromatography (SEC). Because this method diluted the sample, the phospholipid concentration of the liposomal sample was determined by Bartlett method. The leakage assay of calcein-loaded liposomes was done by incubating the liposomes in solutions of sodium cholate, sodium taurocholate and sodium deoxycholate of different concentrations during a longer period of time. At pre-determined time intervals, fluorescence lifetime of the free and entrapped calcein molecules was measured using the time correlated single photon counting method (TCSPC). The results were then analyzed by biexponential curve fitting and the efflux of calcein molecules was determined for each bile salt concentration and incubation time.
The previously done liposomal extrusion resulted in a homogenous fraction of unilamellar liposomes (polydispersity index 0.062) that had an average diameter of 141 nm. All of the bile salts used had an effect on the permeability of liposomal membrane, causing it to leak the entrapped calcein. More precisely, all the bile salts induced graded leakage in phosphatidylcholine liposomes. While sodium cholate and taurocholate caused heterogeneously graded leakage, the exact subgroup of graded leakage could not be determined for sodium deoxycholate. However, sodium deoxycholate had the strongest effect on liposomal membranes, causing them to leak calcein at a very low concentration of 0.5 mM. It has been found that by increasing the bile salt concentration and prolonging the incubation time, one can achieve greater leakage of the entrapped dye. Although this is only true for bile salt concentrations that exceed a specific minimal concentration needed to cause distortions in liposomal bilayers.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 51 pages, 30 figures, 20 tables and 16 references. Original is in Croatian language.

Keywords: EPC liposomes, liposomal leakage, bile salts, fluorescence lifetime, time-correlated single photon counting

Mentor: **Željka Vanić**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Željka Vanić**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ivan Pepić, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Renata Jurišić Grubešić, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September, 2017.