ΜΕΤΡΗΣΗ ΙΞΩΔΟΥΣ ΛΙΠΟΣΩΜΙΚΗΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΕΝΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΩΝ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ

Γεώργιος Κουρμουλάκης[1], Σπυρίδων Μουρτάς[1], Σοφία Γ. Αντιμησιάρη[1,2]
[1] Εργαστήριο Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ρίο Πάτρας, Ελλάδα
[2]Ινστιτούτο Επιστημών Χημικής Μηχανικής, FORTH/ICE-HT, Πλατάνι Πάτρας, Ελλάδα
e-mail: pharmakotriftis@yahoo.gr

Περίληψη

Το ιξώδες εκφράζει την αντίσταση ενός υγρού στη ροή. Όσο αυξάνεται το ιξώδες τόσο αυξάνεται η αντίσταση του υγρού στη ροή. Σκοπός της μελέτης είναι η αύξηση του ιξώδους της λιποσωμικής διασποράς (λιποσώματα: μικροσκοπικά σφαιρικά κυστίδια αποτελούμενα από λιπίδια) με τη βοήθεια αντίδρασης προσθήκης τύπου Michael, με τελικό στόχο την παρασκευή γέλης (γέλη από λιποσώματα). Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται στη εξωτερική επιφάνεια των λιποσωμάτων μεταξύ της ομάδας του μαλεϊμιδίου που υπάρχει σε λιπιδικό παράγωγο πολυαιθυλενογλυκόλης (συστατικό λιποσωμάτων) και της θειολομάδας μιας PEG-διθειόλης (μεγάλου μοριακού βάρους), η οποία προστίθεται στα λιποσώματα. Η δεύτερη θειολομάδα του ίδιου μορίου θεωρητικά θα πρέπει να αντιδράσει με ομάδα μαλεϊμιδίου γειτονικού λιποσώματος. Με τον τρόπο αυτό, η PEG-διθειόλη δρα ως συνδέτης (linker). Η σύνδεση αυτή των λιποσωμάτων αναμένεται να επιφέρει αλλαγές στο ίξώδες της λιποσωμικής διασποράς. Στη μελέτη αυτή παρασκευάστηκαν λιποσώματα ορισμένης συγκέντρωσης ($C_{liposomes}$= 40 mg λιπιδίου PC/ml) που αποτελούνταν από τα εξής λιπίδια (σε συγκεκριμένες αναλογίες): φωσφατυδιλοχολίνη (PC), χοληστερόλη (Chol) και λιπίδιο μαλεϊμίδιο (DSPE-PEG_{2000}-Maleimide). Έπειτα, μετρήθηκαν: το ιξώδες της λιποσωμικής διασποράς και η υδροδυναμική διάμετρος (μέγεθος) των λιποσωμάτων πριν και μετά την προσθήκη συγκεκριμένων ποσοτήτων PEG-διθειόλης, οι οποίες υπολογίζονται βάσει των moles του λιπιδίου μαλεϊμιδίου (στην περίληψη ενδεικτικά αναφέρεται μόνο μία ποσότητα, η οποία είναι: $n_{PEG\text{-διθειόλη}}$= 10*$n_{DSPE\text{-}PEG\mathbf{2000}\text{-}Maleimide}$). Το μέσο ιξώδες των λιποσωμάτων στα οποία προστίθεται PEG-διθειόλη (δείγμα: x10) είναι ίσο με 30.6 mPa*s ± 5.3 αντίθετα το ιξώδες των λιποσωμάτων στα οποία δεν προστίθεται (δείγμα: CONTROL) είναι 1.6 mPa*s ± 0.22. Η μέση υδροδυναμική διάμετρος για το δείγμα CONTROL είναι 90.93 nm ± 0.98, ενώ για το δείγμα x10 είναι 148.0 nm ± 4.5. Επιπρόσθετα πειράματα αποδεικνύουν ότι η αύξηση του ιξώδους της λιποσωμικής διασποράς μπορεί να αποδοθεί μερικώς στην αντίδραση μαλεϊμιδίου- θειόλης.

Λέξεις-Κλειδιά: ιξώδες, γέλη, λιποσώματα, συνδέτης

Abstract

Viscosity is the quantity that describes a fluid's resistance to flow. If viscosity is increased, fluid's resistance to flow is increased. The purpose of this study is the increase in viscosity of liposomal dispersion (liposomes are microscopic spherical vesicles

composed by lipids) due to Michael type addition reaction with the ultimate aim of preparing gel. This reaction happens in the external surface of liposomes between maleimide group (component of liposomes) and a thiol group of PEG-dithiol (high molecular weight molecule) which is added in liposomes. The second thiol group of the same molecule must react with maleimide group of adjacent liposome. Thus, PEG-dithiol acts as linker. The connection among liposomes is going to modify the viscosity of liposomal dispersion. In the study, liposomes with specific lipid concentration ($C_{liposomes}$= 40mg lipid PC/ ml) were prepared. These liposomes were composed by the following lipids (in define proportion): phosphatidylcholine (PC), cholesterol (Chol) and lipid maleimide (DSPE-PEG_{2000}-maleimide). Afterwards, viscosity of liposomal dispersion and hydrodynamic diameter (size) of liposomes were measured before and after the addition of certain quantities of PEG-dithiol, which are determined from moles of lipid maleimide (only one quantity of PEG-dithiol is mentioned in the abstract, $n_{PEG\text{-}dithiol}= 10*n_{DSPE\text{-}PEG2000\text{-}Maleimide}$). The viscosity of liposomes with PEG-dithiol (sample: x10) is an average of 30.6 mPa*s ± 5.3, whereas viscosity of liposomes without the addition of PEG-dithiol (control sample) is of 1.6 mPa*s ± 0.22. The mean hydrodynamic diameter of CONTROL sample is 90.93 nm ± 0.98, while the size of liposomes with PEG-dithiol (sample: x10) is of 148.0 nm ± 4.5. Additional experiments prove that the increase of viscosity can be partly attributed to the reaction between maleimide –thiol.

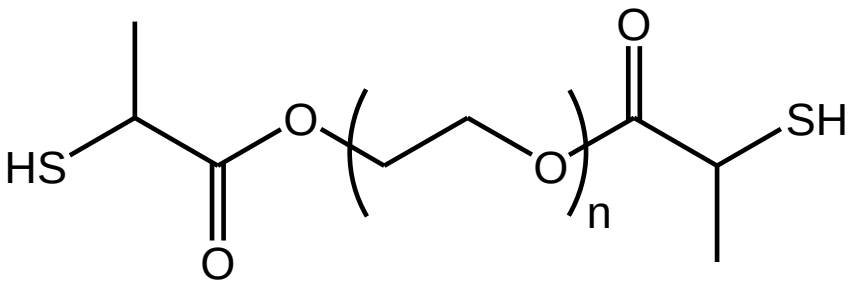
Keywords: viscosity, gel, liposomes, linker

1. Εισαγωγή

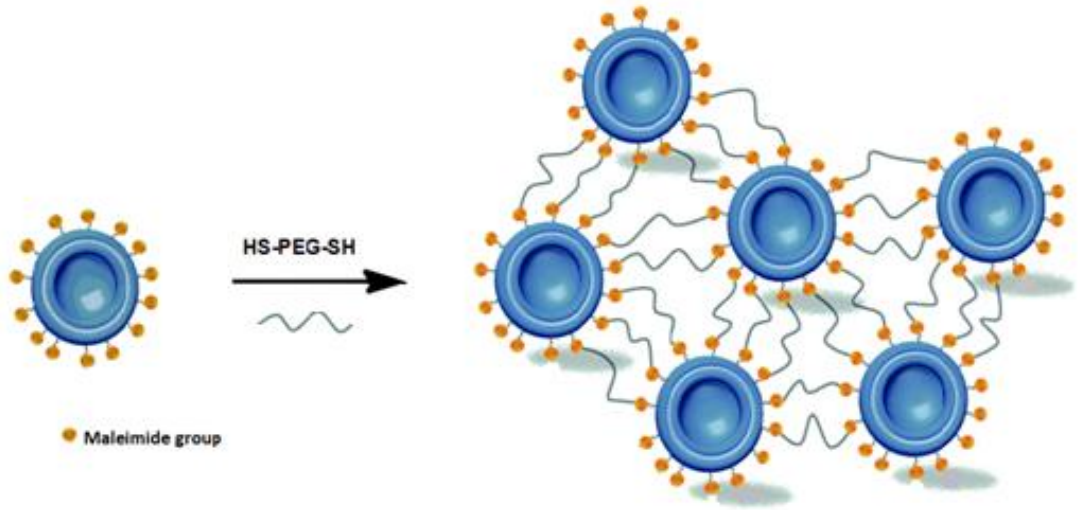
Τα λιποσώματα είναι μικροσκοπικά σφαιρικά σωματίδια που αποτελούνται από μια ή περισσότερες λιπιδικές διπλοστοιβάδες, οι οποίες περικλείουν έναν υδάτινο πυρήνα. Οι λιπιδικές διπλοστοιβάδες αποτελούνται από φυσικά ή/ και συνθετικά λιπίδια καθώς και χοληστερόλη. Τα λιποσώματα χρησιμοποιούνται ως φορείς για τη χορήγηση φαρμάκων (Akbazardeh et al. 2013). Για την τοπική χορήγηση (λόγου χάρη κολπική χορήγηση) των λιποσωμάτων απαιτείται ρύθμιση των ρεολογικών ιδιοτήτων τους (ιξώδες), η οποία επιτυγχάνεται συνήθως με την ενσωμάτωσή τους σε γέλες (S.Mourtas et al. 2010).

Σκοπός της εργασίας είναι η αύξηση του ιξώδους της λιποσωμικής διασποράς με τελικό στόχο την παρασκευή γέλης (γέλη από λιποσώματα) μέσω διασύνδεσης (crosslinking) των λιποσωμάτων (Yinkai Liang 2014). Τα λιποσωμάτα συνδέονται μεταξύ τους με τη βοήθεια ενός παραγώγου PEG-διθειόλης (μεγάλου μοριακού βάρους) (Σχήμα 1). Η PEG-διθειόλη αντιδρά με ομάδες μαλεϊμιδίου (προσθήκη τύπου Michael), οι οποίες έχουν ενσωματωθεί στα λιποσώματα ως λιπίδιο-peg-μαλεϊμίδιο και βρίσκονται στην επιφάνεια των λιποσωμάτων (Εικόνα 1).

Στην εργασία αυτή: α) διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη της PEG-διθειόλης στα λιποσωμικά παρασκευάσματα (λιποσώματα που φέρουν ομάδες μαλεϊμιδίου στην επιφάνειά τους) οδηγεί σε συσσωμάτωση (σύνδεση) των λιποσωμάτων, με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM), β) μελετήθηκε η επίδραση της PEG-διθείολης τόσο στο ιξώδες της λιποσωμικής διασποράς όσο και στο μέγεθος των λιποσωμάτων που φέρουν ομάδες μαλεϊμιδίου στην επιφάνειά τους.



Σχήμα 1: Χημικός τύπος της PEG-dithiol



Εικόνα 1: Τρόπος δράσης της PEG-dithiol

2. Μεθοδολογία

Ακολουθεί μια σύντομη περιγραφή των τεχνικών/ μεθόδων που εφαρμόστηκαν.

2.1 Μέθοδος παρασκευής των λιποσωμάτων

Τα λιποσώματα παρασκεύαζονται με τη μέθοδο ενυδάτωσης του λεπτού λιπιδικού υμενίου. Τα λιπίδια διαλύονται σε οργανικό διαλύτη ή σε μίγμα οργανικών διαλυτών και (αφού διαλυθούν) προστίθενται σε σφαιρική φιάλη. Ο οργανικός διαλύτης εξατμίζεται με περιστροφική εξάτμιση. Όταν εξατμιστεί ο οργανικός διαλύτης, τότε τα λιπίδια αποτίθενται στο εσωτερικό τοίχωμα της σφαιρικής φιάλης ως φιλμ, και με τον τρόπο αυτό σχηματίζεται το λεπτό λιπιδικό υμένιο. Ακολουθεί η ενυδάτωση του λεπτού λιπιδικού υμενίου, δηλαδή προστίθεται υδατικό διάλυμα (PBS, D_2O, υδατικό διάλυμα φαρμάκου: ανάλογα με την πειραματική εφαρμογή των λιποσωμάτων) στη σφαιρική φιάλη. Το υμένιο αποκολλάται από το εσωτερικό τοίχωμα της σφαιρικής φιάλης με μηχανική ανάδευση και λαμβάνεται μια θολερή διασπορά αποτελούμενη από πολυστοιβαδιακά λιποσώματα. Ακολουθεί μείωση του μεγέθους των λιποσωμάτων με χρήση ακίδας

υπερήχων και καθαρισμός τους, ώστε να ληφθεί το τελικό λιποσωμικό παρασκεύασμα (Akbazardeh et al. 2013).

2.2 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)

Μια δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας σαρώνει την επιφάνεια στερεού δείγματος (το οποίο βρίσκεται μέσα σε θάλαμο κενού). Από την επιφάνεια του δείγματος λαμβάνονται πολλά σήματα (λόγου χάρη δευτερογενή και οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια, φωτόνια, ηλεκτρόνια Auger και ακτίνες Χ) τα οποία ενισχύονται, αναλύονται και παράγεται η εικόνα.

2.3 Μέτρηση ιξώδους των λιποσωμικών διασπορών

Το ιξώδες των λιποσωμικών διασπορών προσδιορίστηκε με ιξωδόμετρο σφαίρας, του οποίου η λειτουργία βασίζεται στην αρχή της κυλιόμενης σφαίρας. Το λιποσωμικό δείγμα, του οποίου το ιξώδες πρόκειται να μετρηθεί, εισάγεται σε υάλινο σωλήνα ορισμένης διαμέτρου μέσα στον οποίο έχει προηγουμένως εισαχθεί μια ατσάλινη σφαίρα (ορισμένης πυκνότητας), η οποία κυλάει υπό την επίδραση της βαρύτητας μέσα στον σωλήνα. Ο υάλινος σωλήνας κλίνει υπό ορισμένη γωνία (20^o). Ο χρόνος που απαιτείται προκειμένου η σφαίρα να διανύσει μια ορισμένη απόσταση (που ορίζεται από δυο σημεία) μέσα στον υάλινο σωλήνα είναι ένα μέτρο του ιξώδους του υγρού.

2.4 Μέτρηση μεγέθους των λιποσωμάτων

Το μέγεθος των σωματιδίων (λιποσωμάτων) προσδιορίστηκε με την τεχνική της δυναμικής σκέδασης του φωτός (η οποία είναι γνωστή και ως φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων-PCS). Στη μέθοδο αυτή μονοχρωματική ακτινοβολία προσπίπτει σε σωματίδια (λιποσώματα) του δείγματος (το οποίο έχει προηγουμένως αραιωθεί, ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 0.2 mg λιπιδίου/ ml), το οποίο βρίσκεται μέσα σε μια κυψελίδα. Τα λιποσώματα σκεδάζουν την ακτινοβολία προς όλες τις κατευθύνσεις. Σε μια ορισμένη θέση (σε σχέση με την διεύθυνση της προσπίπτουσας) υπάρχει ο ανιχνευτής ο οποίος μετρά την ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Η δυναμική σκέδαση του φωτός μετράει την κίνηση Brownian των σωματιδίων (συνεχείς και τυχαίες συγκρούσεις των σωματιδίων με τα μόρια του μέσου διασποράς που τα περιβάλουν) και τη συσχετίζει με το μέγεθος των σωματιδίων. Παραδείγματος χάριν, τα μεγάλα σωματίδια κινούνται αργά, συνεπώς η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας θα μεταβάλλεται αργά.

3. Πειραματικό μέρος- Αποτελέσματα

3.1 Λιποσωμικές παρασκευές

Παρασκευάστηκαν λιποσώματα με τη μέθοδο ενυδάτωσης λιπιδικού υμενίου, που αποτελούνταν από τα εξής λιπίδια: PC (φωσφατυδιλοχολίνη), Chol (χοληστερόλη) καθώς και τα λιπίδια DSPE-PEG_{2000}-OMe και DSPE-PEG_{2000}-Maleimide (λιπίδιο-peg-μαλεϊμίδιο).

Λιποσωμικές συστάσεις:

- PC/ Chol/ DSPE-PEG_{2000}-**Mal** (2: 1: 0.03) σε PBS, C_{lips}= 40 mg/ml (**Lips-Mal**)

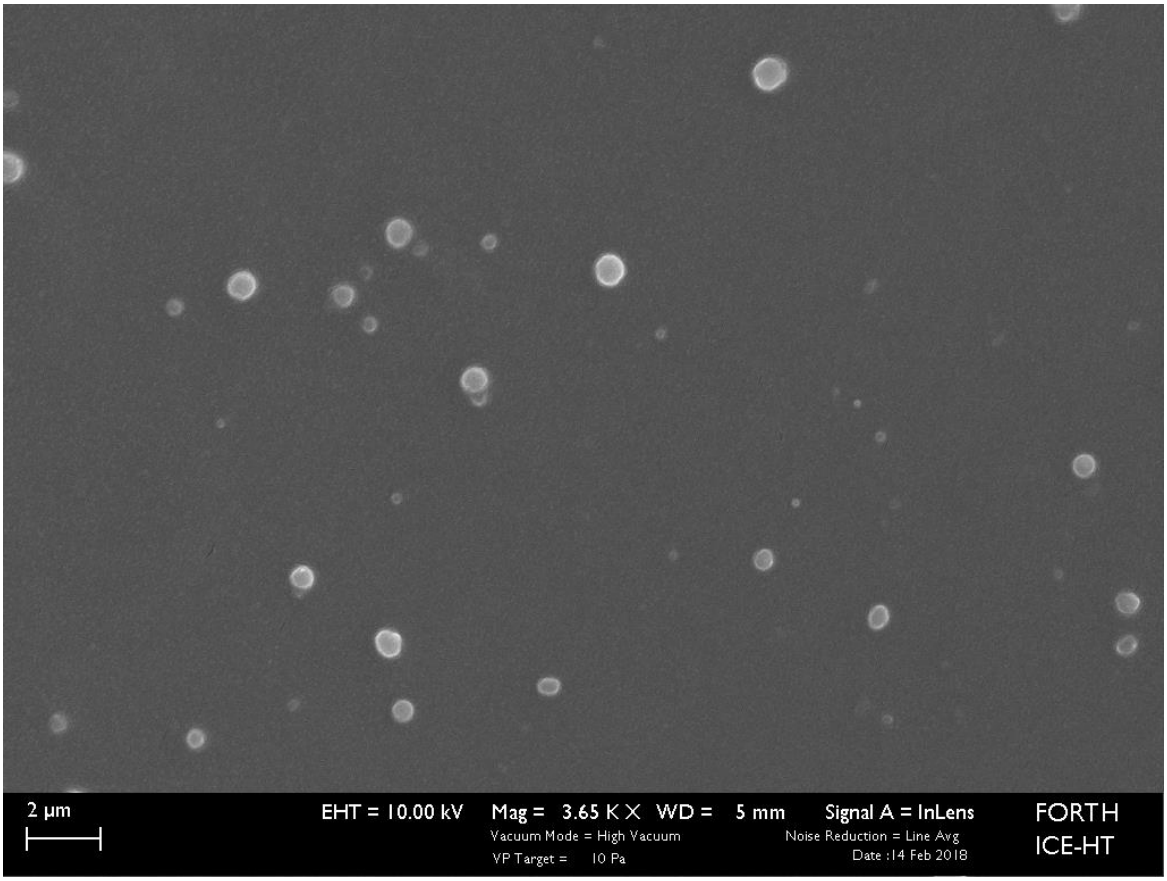
- PC/ Chol/ DSPE-EG_{2000}-OMe (2: 1: 0.03) σε PBS, C_{lips}= 40 mg/ml (**Control Lips**)
- PC/ Chol/ DSPE-EG_{2000}-OMe (2: 1: 0.18) σε PBS, C_{lips}= 40 mg/ml.

3.2 Πειραματική πορεία

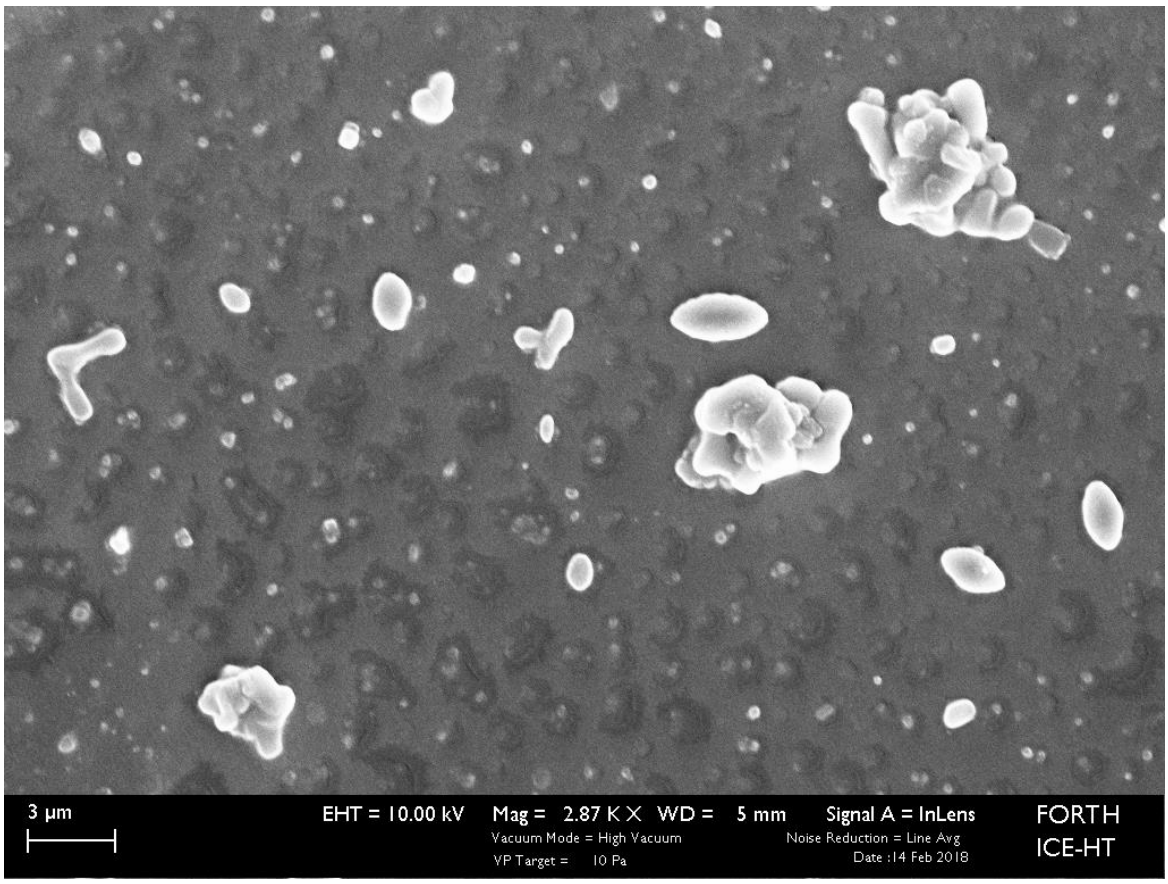
Στα ανωτέρω λιποσώματα (**Lips-Mal** και **Control Lips**) προστίθενται διαφορετικές ποσότητες PEG-διθειόλης, οι οποίες υπολογίζονται με βάση τα moles του λιπίδιου – μαλεϊμιδίου. Συνεπώς, προέκυψαν τα δείγματα: **control** (στο οποίο δεν προστίθεται PEG-διθειόλη), **x0.1**, **x2.5**, **x5** και **x10**. Στη συνέχεια, μετράται το ιξώδες και το μέγεθος των λιποσωμάτων των ανωτέρω δειγμάτων.

3.3 Αποτελέσματα

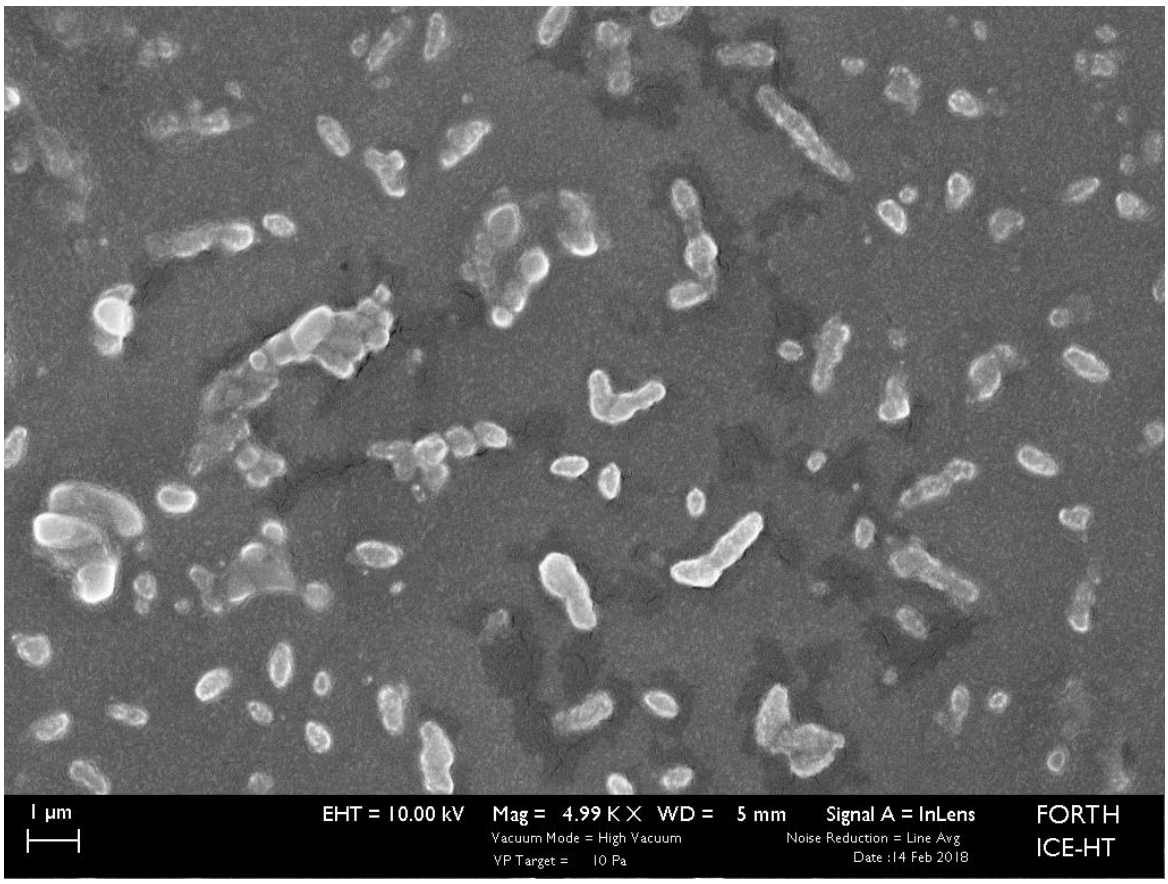
Παρακάτω παρατίθενται εικόνες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης για τα λιποσώματα που φέρουν στην επιφάνειά τους ομάδες μαλεϊμιδίου (**Lips-Mal**) και πιο συγκεκριμένα για τα δείγματα: **control** (στο οποίο δεν προστίθεται PEG-διθειόλη) (Εικόνα 2) και για το δείγμα **x2.5** (Εικόνα 3 & 4).



Εικόνα 2: Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης για τα λιποσώματα που φέρουν στην επιφάνειά τους ομάδες μαλεϊμιδίου (**Lips-Mal**) πριν την προσθήκη της PEG-διθειόλης (δείγμα **control**).



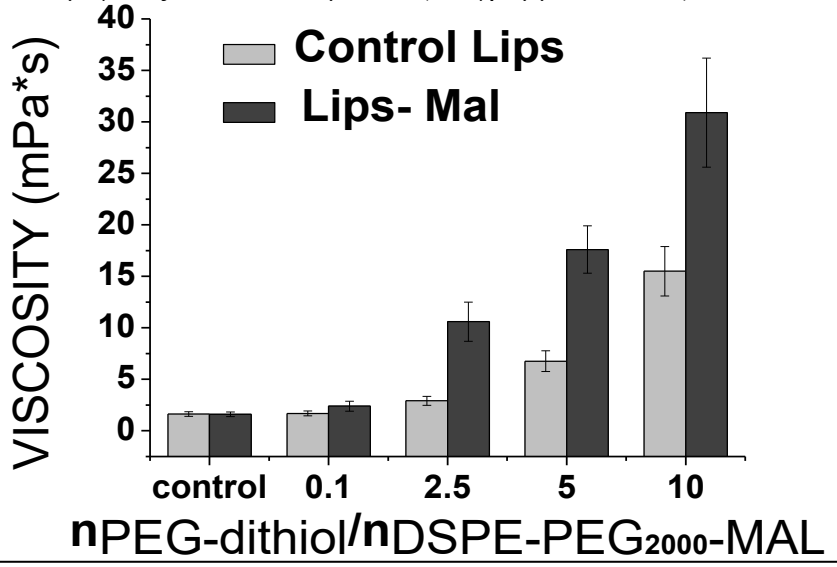
Εικόνα 3: Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης για τα λιποσώματα που φέρουν στην επιφάνειά τους ομάδες μαλεϊμιδίου (**Lips-Mal**) μετά την προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας PEG-διθειόλης (δείγμα **x2.5**).



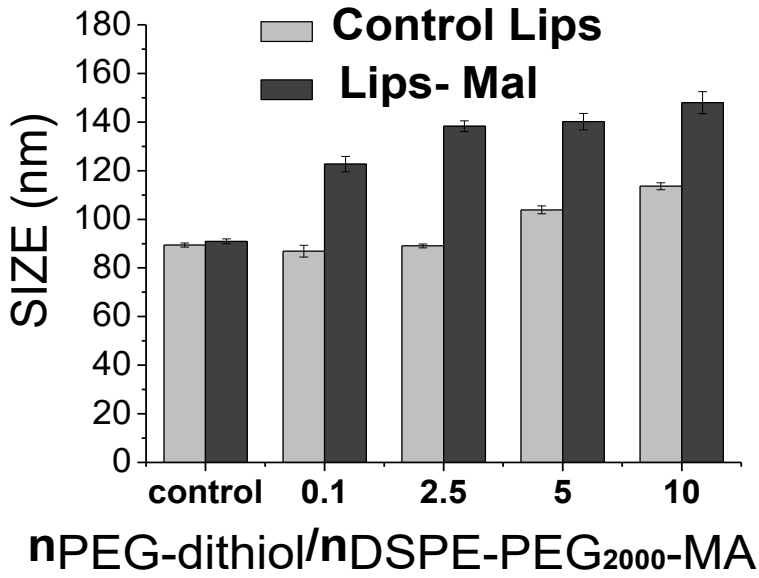
Εικόνα 4: Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης για τα λιποσώματα που φέρουν στην επιφάνειά τους ομάδες μαλεϊμιδίου (**Lips-Mal**) μετά την προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας PEG-διθειόλης (δείγμα **x2.5**).

Στο λιποσωμικό δείγμα στο οποίο προστίθεται PEG-διθείολη (δείγμα **x2.5**) παρατηρείται σχηματισμός συσσωματωμάτων. Η PEG-διθειόλη οδηγεί στη σύνδεση/ συσσωμάτωση των λιποσωμάτων.

Ακολουθεί η μελέτη της επίδρασης της PEG-διθειόλης στο ιξώδες της λιποσωμικής διασποράς και στο μέγεθος των λιποσωμάτων (Διαγράμματα 1 & 2).



Διάγραμμα 1: Ιξώδες λιποσωμικής διασποράς έναντι της προστιθέμενης ποσότητας PEG-διθειόλης.



Διάγραμμα 2: Μέγεθος λιποσωμάτων έναντι της προστιθέμενης ποσότητας PEG-διθειόλης.
Το μέγεθος των λιποσωμάτων πριν (control) και μετά την προσθήκη της PEG-διθειόλης κυμαίνεται από τα 90 nm έως τα 153 nm.

Από το Διάγραμμα 1: για το ίδιο δείγμα, δηλαδή προστίθεται η ίδια ποσότητα PEG-διθειόλης στα **Control Lips** και **Lips-Mal** παρατηρούμε ότι: το ιξώδες των λιποσωμάτων **Lips-Mal** αυξάνεται σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με το ιξώδες των **Control Lips**. Αυτή η επιπλέον αύξηση του ιξώδους μπορεί να αποδοθεί στην ειδική αντίδραση μεταξύ των ομάδων μαλεϊμιδίου των λιποσωμάτων και της PEG-διθειόλης.

Στον παρακάτω πίνακα μελετάται η επίδραση του μεγέθους των λιποσωμάτων στο ιξώδες της λιποσωμικής διασποράς.

Πίνακας 1: Σχέση μεταξύ μεγέθους των λιποσωμάτων και ιξώδους λιποσωμικής διασποράς

SIZE vs VISCOSITY		
PC/ Chol/ DSPE-PEG$_{2000}$-OME (2: 1: 0.18) {WITHOUT MALEIMIDE}		
$C_{LIPOSOMES}$=40$\frac{mg}{ml}$		
SIZE (nm)	**PDI**	**Viscosity (mPa*s)**
83.27 ± 0.96	0.181 ± 0.047	1.615± 0.203
123.1 ± 0.3	**0.252 ± 0.012**	**1.60 ± 0.19**
249 ± 91	**0.285 ± 0.066**	**1.633 ± 0.205**
1100 ± 156	0.865 ± 0.065	2.13 ± 0.32

Από το Διάγραμμα 2 και τον Πίνακα 1 διαπιστώνουμε ότι το μέγεθος των λιποσωμάτων δεν επηρεάζει το ιξώδες της λιποσωμικής διασποράς.

4. Συμπεράσματα

- Η προσθήκη PEG-διθειόλης σε λιποσώματα που φέρουν στην επιφάνειά τους ομάδες μαλεϊμιδίου οδηγεί σε αύξηση του ιξώδους και του μεγέθους των

λιποσωμάτων, η οποία οφείλεται κυρίως στην ειδική αντίδραση (αντίδραση μεταξύ λιποσωμάτων που φέρουν μαλεϊμίδιο στην επιφάνειά τους και θειολομάδων της PEG-dithiol).

- Η αύξηση του ιξώδους της λιποσωμικής διασποράς δεν οφείλεται στο μέγεθος των λιποσωμάτων.

5. Βιβλιογραφία

[1] Akbazardeh, et al., *Liposome: classification, prparation, and applications*, Nanoscale Reaserch Letters, Issue 8, p.102, 2013, Iran.

[2] Spyridon Mourtas, Christos A. Aggelopoulos, Pavlos Klepetsanis. *Complex Hydrogel Systems Composed of Polymers, Liposomes, and Cyclodextrins: Implications of Composition on Rheological Properties and Aging*, Langmuir, Issue 25 (15), p.p. 8480-8488, 2009, Greece.

[3] S. Mourtas, et al. *Liposomal Gels for Vaginal Delivery of the MC-1220: Preparation and in vivo vaginal toxicity and pharmacokinetics*, Nano LIFE, Issue 1,p.p. 195-205, 2010, Greece.

[4] Yingkai Liang, Kristi L. Kiick. *Multifunctional lipid- coated polymer nanogels crosslinked by photo-triggered Michael – type addition*, Polymer Chemistry, Issue 5, p.p. 1728-1736, 2014,