

MAGDALENA ŁUKASIEWICZ

(UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI)

UKŁADY LIPOSOM-POLIMER JAKO NOŚNIKI BIAŁEK ZAKOTWICZONYCH PRZEZ GPI

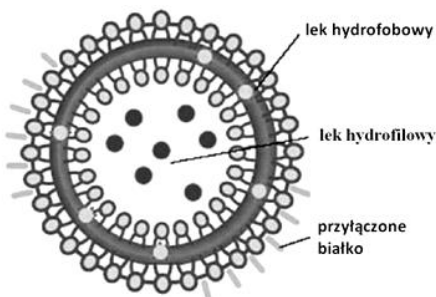
WSTĘP

Od lat osiemdziesiątych XX wieku obserwuje się intensywny rozwój nowej dziedziny wiedzy zwanej technologią liposomalną. Bazuje ona na zastosowaniu liposomów, czyli lipidowych pęcherzyków o rozmiarach nanometrycznych, które mają zdolność do zamykania oraz transportu substancji biologicznie aktywnych. Badania ostatnich kilku dziesięcioleci pokazały, że liposomy stanowią idealny rodzaj nośników praktycznie dla każdego typu substancji, zarówno tych, które są rozpuszczalne w wodzie, jak i tych, które rozpuszczają się w rozpuszczalnikach niepolarnych (środowisko hydrofobowe). Od końca lat siedemdziesiątych zaczęto prowadzić badania nad zamykaniem, a następnie kontrolowanym dostarczaniem białek, w tym białek mających zdolność wiązania się z dwuwarstwą lipidową nośnika. To, co stanowi obecnie wyzwanie dla naukowców, to próby zwiększenia stopnia enkapsulacji białka w liposomie, a także wzrost stabilności układu, tak by móc go w przyszłości zastosować w medycynie i farmakologii. W tym celu projektuje się układy określane mianem *layer some*, czyli liposomy (zawierające substancję biologicznie aktywną, np. białko) otoczone jedną lub kilkoma warstwami polimeru. Kolejnym wyzwaniem, poza zoptymalizowaniem stabilności pęcherzyka liposomalnego, jest utrzymanie na wystarczającym, terapeutycznym poziomie aktywności enzymatycznej zamykanego białka.

LIPOSOMY

Liposomy to pęcherzyki fosfolipidowe o rozmiarach nanometrycznych, powstające samoistnie z fosfolipidów. Ich utworzenie jest ściśle związane z kształtem cząsteczek lipidowych oraz minimalizacją energii brzegowej tworzącej się nanostruktury. Utworzony w ten sposób pęcherzyk jest termodynamicznie metastabilnym układem, którego stabilność jest ściśle determinowana siłą napięcia powierzchniowego¹. Formujący się w środowisku wodnym liposom zamyka pewną objętość roztworu, w którym może być rozpuszczona np. substancja terapeutyczna. Substancje aktywne mogą być zawarte nie tylko we wnętrzu liposomów (substancje hydrofilowe), ale także w dwuwarstwie lipidowej (substancje hydrofobowe). Do dwuwarstwy lipidowej mogą inkorporować także białka (Ryc. 1), jak np. białka kotwiczące przez specjalną, hydrofobową kotwicę glikozylofosfatydyloinozytolową określaną jako GPI. Zawiera ona w swej strukturze hydrofobowe łańcuchy węglowodorowe kwasów tłuszczowych związanych kowalencyjnie z grupami OH glicerolu.

Ryc. 1. Sposoby enkapsulacji substancji biologicznie aktywnych w liposomie



Zmodyfikowane na podstawie: <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1222>

Zarówno budowa warstwy lipidowej liposomów, jak i ich zdolność do zamykania w swym wnętrzu pewnych objętości roztworów stały się motorem rozwoju nowych kierunków badań. Badacze skupili się na dwóch najważniejszych aspektach:

¹ K. Stebelska, P. Wyrozumska, M. Grzybek, A. F. Sikorski, *Characterization and medical applications of liposome constructions*, „Advances in Clinical and Experimental Medicine” 2002, nr 11 (2), s. 229–242.

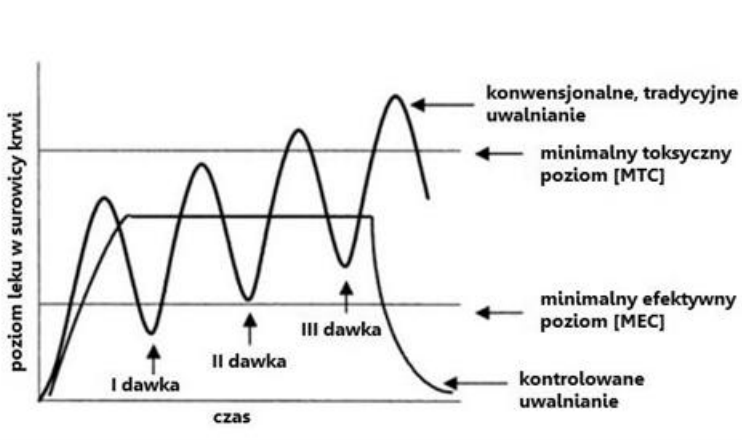
- na zastosowaniu liposomów jako układów do kontrolowanego uwalniania leków i innych substancji leczniczych biologicznie czynnych;
- na badaniach podstawowych właściwości dwuwarstwy lipidowej jako prostego modelu błony biologicznej.

Rozważając liposomy jako potencjalne nośniki substancji terapeutycznych należy zwrócić uwagę na cechy, jakimi powinien odznaczać się taki nośnik. Przede wszystkim powinien być:

- chemicznie i biologicznie nieaktywne;
- biokompatybilny;
- odporny mechanicznie;
- zdolny do transportu dużej ilości leku;
- zabezpieczony przez przypadkowym uwolnieniem substancji aktywnej;
- łatwy do dostarczenia oraz łatwy do usunięcia z organizmu;
- łatwy w produkcji oraz sterylizacji.

Porównując profile konwencjonalnego oraz kontrolowanego dostarczenia substancji biologicznie aktywnych (Ryc. 2), widać, że stały poziom leku w surowicy krwi udaje się utrzymać poprzez zastosowanie kontrolowanego uwalniania.

Ryc. 2. Porównanie profilu kontrolowanego dostarczenia leku do profilu konwencjonalnego



Zmodyfikowane na podstawie: <http://www.globalspec.com/reference/78204/203279/Chapter-22-Design-of-controlled-release-drug-delivery%20systems>

Unika się w nim schodzenia poniżej minimalnego efektywnego stężenia leku (MEC), a także przekraczania minimalnego toksycznego poziomu (MTC). Niektóre substancje lecznicze posiadają dość wąskie okno terapeutyczne, w związku z tym dostarczanie leku często wiązało się z licznymi, poważnymi skutkami ubocznymi. Dzięki zastosowaniu liposomów, które uwalniają lek w sposób kontrolowany, można dopasować z dużą większą precyzją stężenie substancji aktywnej, tak aby zawierało się ono pomiędzy dwoma poziomami MEC oraz MTC.

Kolejną zaletą zastosowania liposomów jest **ukierunkowanie**. Oznacza to, że lek jest kierowany ściśle do miejsca swego przeznaczenia (kontrola przestrzenna). Dzięki temu ogranicza się ryzyko przedawkowania i występowania efektów ubocznych.

Trwają badania nad efektywnym zamykaniem i dostarczaniem białek oraz czynników wzrostu².

TRWAŁOŚĆ LIPOSOMÓW I METODY ICH STABILIZACJI

Ze względu na niską trwałość układów liposomalnych oraz dynamizm tworzonych przez fosfolipidy struktur (na co wpływają: obecność wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydrofilowymi, oddziaływania dipol-dipol, wiązania van der Waalsa między cząsteczkami lipidowymi) przechowuje się je w ciemności, w atmosferze beztlenowej, w stanie zamrożonym, stosując przy tym antyutleniacze. Należy również nadmienić, że niestabilność pęcherzyków lipidowych jest bez wątpienia związana z ich rozmiarem. Wraz ze zmniejszeniem rozmiarów liposomów w ich strukturach pojawiają się coraz większe naprężenia. Skutkuje to pojawianiem się problemów w utrzymaniu integralności błony lipidowej, co w ostateczności prowadzi do jej pęknięcia. Po podaniu liposomów do organizmu zmieniają się diametralnie warunki. Gwałtowny wzrost temperatury czy oddziaływanie z białkami osocza skutkuje wzrostem destabilizacji układów liposomal-

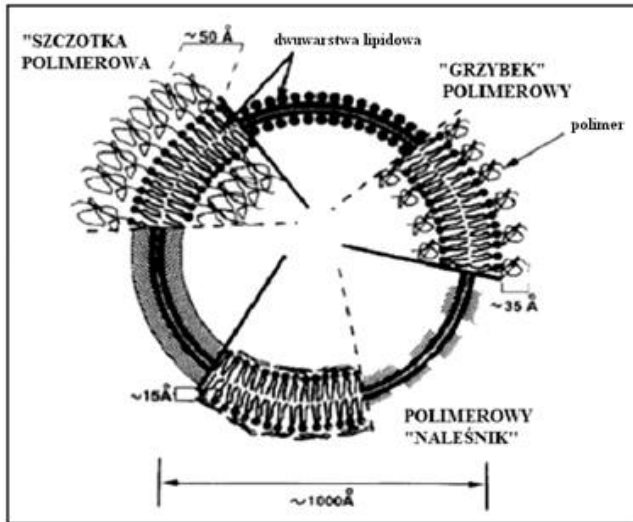
² L. Marquez, F. A. Mauad de Abrau, C. Ferreira, G. Alves, M. Miziara, J. Alves, *Enhanced bone healing of rat tooth sockets after administration of epidermal growth factor (EGF) carried by liposome*, „Injury” 2012, w druku; Q. Xiang, J. Xiao, H. Zhang, X. Zhang, M. Lu, H. Zhang, Z. Su, W. Zhao, C. Lin, Y. Huang, X. Li, *Preparation and characterisation of bFGF-encapsulated liposomes and evaluation of wound-healing activities in the rat*, „Burns” 2011, nr 37, s. 886–895; C. Feng, C. Zhang, X. Shao, Q. Liu, Y. Qian, L. Feng, J. Chen, Y. Zha, Q. Zhang, X. Jiang, *Enhancement of nose-to-brain delivery of basic fibroblast growth factor for improving rat memory impairments induced by co-injection of β -amyloid and ibotenic acid into the bilateral hippocampus*, „International Journal of Pharmaceutics” 2012, nr 423, s. 226–234; F. Ronzon, S. Morandat, B. Roux, M. Bortolato, *Insertion of a Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Enzyme into Liposomes*, „The Journal of Membrane Biology” 2004, nr 197, s. 169–177; K. Suzuki, Y. Okumura, *GPI-Linked Proteins Do Not Transfer Spontaneously from Erythrocytes to Liposomes. New Aspects of Reorganization of the Cell Membrane*, „Biochemistry” 2000, nr 39, s. 9477–9485.

nych. Ponadto liposomy są wychwytywane przez układ siateczkowo-śródbłonkowy wątroby i śledziony. Inną metodą dezintegracji błony liposomów jest oddziaływanie z lipoproteinami o małej i dużej gęstości. W przypadku podania doustnego lipidy budujące liposomy są trawione w przewodzie pokarmowym, gdyż jako naturalnie występujące w organizmach żywych są traktowane jako składnik odżywczy. Aby poprawić właściwości tego typu układów, należy zwiększyć ich trwałość. W tym celu liposomy poddaje się³:

- modyfikacjom rozmiarów oraz ich potencjałów zeta;
- inkorporacji cholesterolu lub sfingomieliny, co wpływa na stopień uporządkowania oraz płynność dwuwarstwy lipidowej;
- procesowi przyłączania hydrofilowych cząstek, takich jak glikolipidy, polisacharydy czy syntetyczne polimery, dzięki czemu tworzy się cienka warstewka wody na powierzchni liposomu, co utrudnia adhezję białek osocza; tego typu liposomy noszą nazwę *Stealth* liposomów (Ryc. 3):

³ M. Ciobanu, B. Heurtault, C. Ruhlmann, C. D. Muller, B. Frisch, *Layersome: Development and optimization of stable liposomes as drug delivery system*, „International Journal of Pharmaceutics” 2007, nr 344, s. 154–157; S.-S. Feng, G. Ruan, Q.-T. Li, *Fabrication and characterizations of a novel drug delivery device liposomes-in-microsphere (LIM)*, „Biomaterials” 2004, nr 25, s. 5181–5189; M. Machuf, O. Regev, Y. Peled, J. Kost, S. Cohen, *Characterization of microencapsulated liposome system for the controlled delivery of liposome-associated macromolecules*, „Journal of Controlled Release” 1996, nr 43, s. 35–45; M. Xiaomei, Z. Zhensheng, *Preparation and properties of poly(vinyl alcohol)-stabilized liposomes*, „International Journal of Pharmaceutics” 2006, nr 318, s. 55–61; H. Takeuchi, H. Yamamoto, T. Toyoda, H. Toyobuk, T. Hino, Y. Kawashima, *Physical stability of size controlled small unilamellar liposomes coated with a modified polyvinyl alcohol*, „International Journal of Pharmaceutics” 1998, nr 164, s. 103–111; G. Angelini, S. Boncompagni, P. De Maria, A. Fontana, C. Gasbarri, G. Siani, *Kinetic evolution of the effect of layer by layer deposition of polyelectrolytes on the stability of POPC liposomes*, „Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects” 2008, nr 322, s. 234–238; M. L. Immordino, F. Dosio, L. Cattel, *Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential*, „International Journal of Nanomedicine”, September 2006, s. 297–315; D. Lasic, B. Ceh, *Stealth Liposomes: From Theory To Product*, „Advanced Drug Delivery Reviews” 1994, nr 24, s. 165–177.

Ryc. 3. Liposomy typu *Stealth*

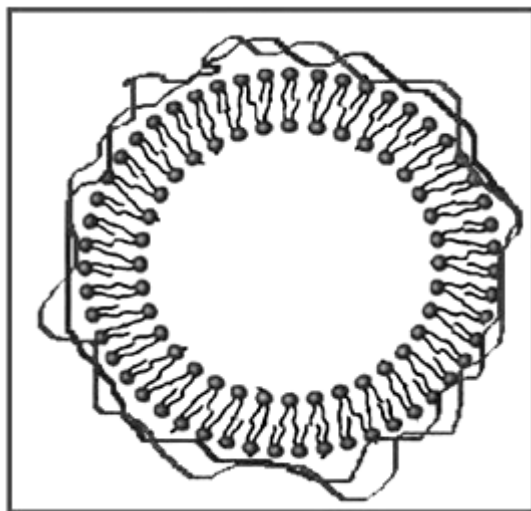


Zmodyfikowany na podstawie: <http://www.biotechnolog.pl/artykul-208.htm>

- tworzeniu układów liposom-polimer, czyli tzw. układów *layer-some*. Proces ten polega na pokrywaniu powierzchni liposomu polielektrolitem (Ryc. 4). Układy polimerowe stabilizujące pęcherzyki liposomalne mogą być zróżnicowane w zależności od tego, ile warstw polimerów jest naniesionych na liposom. Warstwy polielektrolitowe nanosi się najczęściej techniką *layer-by-layer* (LbL), czyli warstwa po warstwie. Jest to stosunkowo nowa metoda, cechująca się dużą prostotą, uniwersalnością oraz możliwością kontroli grubości filmu (można znaleźć liczbę kroków potrzebnych do adsorpcji filmu o danej grubości) w skali nanometrów. Metoda ta znalazła szerokie zastosowanie w nanotechnologii przy produkcji nanokompozytów, materiałów fonicznych, w inżynierii genetycznej czy w biotechnologii⁴.

⁴ G. Decher, J. B. Schlenoff, *Multilayer thin films*, Wiley-VCH 2003.

Ryc. 4. Liposom typu *layersome* stabilizowany polielektrolitami



Źródło: Opracowanie własne

LIPOSOMY A ODPOWIEDŹ IMMUNOLOGICZNA

Liposomy są stosowane do hamowania bądź wzmacniania odpowiedzi immunologicznej. Pełnią zatem funkcję *a d i u w a n t ó w*. Idealny adiuwant powinien być bezpieczny oraz nietoksyczny. Ich powierzchnię można modyfikować za pomocą białek, w tym immunoglobulinami rozpoznawalnymi oraz wiązalnymi przez receptory i antygeny znajdujące się na powierzchni komórek⁵. Badania pokazują, że można przyłączać przeciwciała monoklonalne bezpośrednio do końców łańcuchów pochodnych PEG sterycznie stabilizowanych nośników liposomalnych⁶. Liposomy modyfikowane białkami znalazły zastosowanie w eksperymentach nad procesami prezentacji antygeny przez komórki APC (ang. Antigen presenting cells)⁷. Są one traktowane jako modele drobnoustrojów⁸. Przy-

⁵ K. Stebelska, P. Wyrozumska, M. Grzybek, A. F. Sikorski, op. cit., s. 229–242.

⁶ G. Bendas, A. Krause, U. Bakowsky, J. Vogel, U. Rothe, *Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique*, „International Journal of Pharmaceutics” 1999, nr 181, s. 79–93.

⁷ K. Stebelska, P. Wyrozumska, M. Grzybek, A. F. Sikorski, op. cit., s. 229–242.

⁸ T. Nakanishi, A. Hayashi, J. Kunisawa, Y. Tsutsumi, K. Tanaka, Y. Yashiro Ohtani, M. Nakanishi, H. Fujiwara, T. Hamaoka, T. Mayumi, *Fusogenic liposomes efficiently deliver exogenous antigen through the cytoplasm into the MHC class I processing pathway*, „European Journal of Immunology” 2000, nr 30, s. 1740–1747.

kładowym związkiem immunosupresyjnym jest m e t o t r e x a t (MTX). Jest on antagonistą kwasu foliowego, często stosowanym w chorobach nowotworowych bądź w mniejszych dawkach jako lek immunosupresyjny (hamujący lub zapobiegający aktywności układu immunologicznego). Badania pokazują, że enkapsulacja tego leku w liposomach pokrywanych albuminą surowicy bydłowej (BSA) może modyfikować jego działanie, podnosząc bądź obniżając odpowiedź immunologiczną⁹.

BIAŁKA KOTWICZĄCE PRZEZ GPI

Białka można podzielić według kilku kryteriów. Pierwszym z nich jest skład chemiczny, zgodnie z którym białka można sklasyfikować jako proste lub złożone. Do białek prostych (zawierających wyłącznie aminokwasy) należą histony, albuminy, globuliny oraz skleroproteiny. Do złożonych natomiast (zawierających tzw. grupy p r o s t e t y c z n e, czyli składnik niebiałkowy) zalicza się: metaloproteiny, glikoproteiny, nukleoproteiny, lipoproteiny, fosfoproteiny, chromoproteiny. Białka można podzielić także na podstawie pełnionych funkcji biologicznych na strukturalne, enzymy, hormony, transportowe itd.

Ze względu na strukturę białka można sklasyfikować jako globularne, włókniste oraz błonowe¹⁰. Białka błonowe zawierają ugrupowania hydrofobowe, które w najprostszym przypadku są przyłączane kowalencyjnie do cząsteczki proteiny. Jednym z rodzajów białek błonowych są białka wiążące się z dwuwarstwą lipidową poprzez hydrofobowe łańcuchy węglowodorowe kwasów tłuszczowych. Łańcuchy te są związane kowalencyjnie z grupami hydroksylowymi glicerolu. Kotwica GPI jest dodawana do C-końca cząsteczki białka w posttranslacyjnej obróbce¹¹. Dzięki obecności ugrupowania wiążącego, kotwiczącego

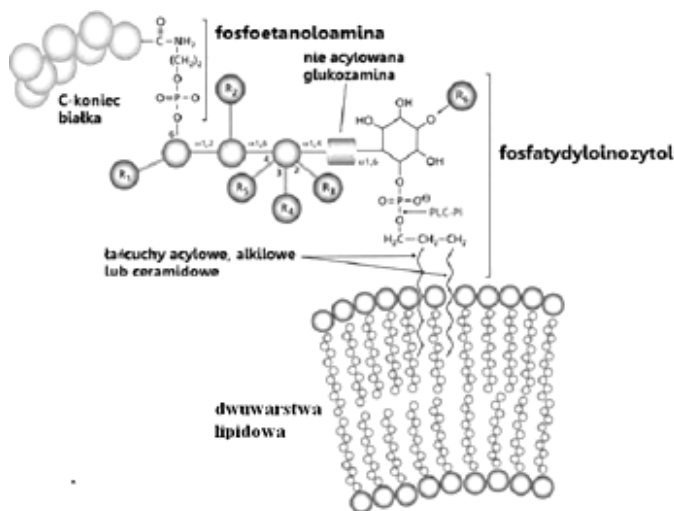
⁹ M. Zimecki, J. Artym, *Effect of methotrexate on the immune response in selected experimental models*, „Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej” 2004, nr 58, s. 226–235.

¹⁰ H. Petty, *Characterization of Cellular Proteins*, „Current Protocols in Cell Biology” 1998, s. 5.1.1–5.1.10.

¹¹ O. Nosjean, A. Briolay, B. Roux, *Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions*, „Biochimica et Biophysica Acta” 1997, nr 1331, s. 153–186; *GPI-anchored biomoleculassan oVerView*, in *GPIanchored membrane proteins and carbohydrates*, eds. D. C. Hoessli, S. Ilangumaran, 1999, s 1–14; M. A. Ferguson, *The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research*, „Journal of Cell Science” 1999, nr 112, s. 2799–2809; M. A. Ferguson, S. W. Homans, R. A. Dwek, T. W. Rademacher, *Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein to the membrane*, „Science” 1988, nr 239, s. 753–759; M. A. Ferguson, M. G. Low, G. A. Cross, *Glycosylsn-1,2-dimyristylphosphatidylinositol is covalently linked to Trypanosoma brucei variansurface glycoprotein*, „The Journal of Biological Chemistry” 1985, nr 260, s. 14547–14555; S. W. Homans, M. A. Ferguson, R. A. Dwek, T. W. Rademacher, R. Anand, A. F. Williams, *Complete structure of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of rat brain Thy-1 glycoprotein*, „Nature” 1988, nr 333, s. 269–272.

w dwuwarstwie lipidowej, białka te występują na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej¹². Strukturę ugrupowania glikozylfosfatidyloinozytolu przedstawiono na poniższym schemacie (Ryc. 5).

Ryc. 5. Schemat ugrupowania glikozylfosfatidyloinozytolowego



Zmodyfikowany na podstawie: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/proteomics/post-translational-analysis/glycosylation/structures-symbols/gpi-anchor-structure.html>

Czynnikiem separującym białko GPI od dwuwarstwy lipidowej jest f o s f o l i p a z a C. Dzięki niej można kontrolować oraz regulować ilość przyłączonego/uwolnionego białka.

ROLA BIAŁEK WIĄŻĄCYCH SIĘ PRZEZ GLIKOZYLOFOSFATYDYLOINOZYTOL

Białka zawierające w swej strukturze ugrupowanie GPI występują u organizmów eukariotycznych, pełniąc tam różnorodne funkcje, w tym:

¹² M. A. Ferguson, *The structure, biosynthesis and functions...*, op. cit., s. 2799–2809; B. Eisenhaber, S. Maurer-Stroh, M. Novatchkova, G. Schneider, F. Eisenhaber, *Enzymes and auxiliary factors for GPI lipid anchor biosynthesis and post-translational transfer to proteins*, „BioEssays” 2003, nr 25, s. 367–385; A. Tiede, I. Bastisch, J. Schubert, P. Orlean, R. E. Schmidt, *Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols in mammals and unicellular microbes*, „The Journal of Biological Chemistry” 1999, nr 380, s. 503–523.

- e n z y m ó w, jak np. fosfataza alkaliczna biorąca udział w procesie b i o m i n e r a l i z a c j i kości czy acetylocholinesteraza rozkładająca neuroprzekaznik acetylocholinę;
- a n t y g e n ó w u ssaków, jak np. Thy-1 czy CD14;
- p r z e c i w c i a ł¹³.

CELE PRACY

Głównym celem pracy jest opracowanie stabilnych nanonośników liposomalnych, mających zastosowanie w kontrolowanym dostarczaniu białka fosfatazy alkalicznej (ALP). Prowadzone są badania nad polepszeniem stabilności układów *layersome* oraz utrzymaniem aktywności przyłączanego białka na dość wysokim, terapeutycznym poziomie. Białko to ma szerokie zastosowanie w farmakologii przy leczeniu sepsy wywoływanej endotoksynami produkowanymi przez bakterie Gram-ujemne¹⁴ czy w leczeniu hipofosfatazji¹⁵. W inżynierii tkankowej kości fosfataza alkaliczna pełni rolę promotora mineralizacji ruszto- wań komórkowych¹⁶. Ze względu na obecność ugrupowania GPI administracja tego białka jest wyjątkowo ułatwiona poprzez zastosowanie liposomów jako nośników. Liposomy zapewniają długotrwałe, kontrolowane uwalnianie oraz wydłużają czas jego działania.

FOSFATAZA ALKALICZNA JAKO PRZYKŁAD BIAŁKA KOTWICZĄCEGO PRZEZ GPI

Fosfataza alkaliczna jest enzymem hydrolitycznym cechującym się brakiem swoistości¹⁷. Jest metaloproteiną posiadającą w swej strukturze dwie prawie identyczne podjednostki zawierające dwa jony cynku. Jeden z nich jest odpo-

¹³ E. W. Murray, S. M. Robbins, *Antibody Cross-linking of the Glycosylphosphatidylinositol-linked Protein CD59 on Hematopoietic Cells Induces Signaling Pathways Resembling Activation by Complement*, „The Journal of Biological Chemistry” 1998, nr 273 s. 25279–25284.

¹⁴ K. Poelstra, W. W. Bakker, P. A. Klok, M. J. Hardonk, D. K. Meijer, *A physiologic function for alkaline phosphatase: endotoxin detoxification*, „Laboratory Investigation” 1997, nr 76, s. 319–327.

¹⁵ T. Nishioka, S. Tomatsu, M. A. Gutierrez, K. I. Miyamoto, G. G. Trandafirescu, P. L. C. Lopez et al., *Enhancement of drug delivery to bone: characterization of human tissue-nonspecific alkaline phosphatase tagged with an acidic oligopeptide*, „Molecular Genetics and Metabolism” 2006, nr 88, s. 244–255.

¹⁶ S. SooJee, L. Culver Y., Li, E. P. Douglas, L. B. Gower, *Biomimetic mineralization of collagen via an enzyme-aided PILP process*, „Journal of Crystal Growth” 2010, nr 312, s. 1249–1256.

¹⁷ P. Koczczyński, *Możliwości zastosowania wybranych markerów obrotu kostnego w stomatologii*, „Nowiny Lekarskie” 2004, nr 73, s. 318–320.

wiedzialny za utrzymanie stabilnej budowy białka, drugi natomiast odpowiada za aktywność enzymatyczną ALP. Dzięki zdolnościom hydrolitycznym fosfataza alkaliczna pełni funkcję katalizatora w reakcji hydrolizy estrów monofosforanowych. W jej wyniku uwalniany jest odpowiedni alkohol oraz cząsteczki kwasu fosforowego, które w organizmie występują w formie zjonizowanej. Maksimum aktywności enzymatycznej tego enzymu przypada na pH 9-10¹⁸. ALP bierze udział w transporcie metabolitów przez błonę komórkową¹⁹. Fosfataza alkaliczna dostarcza *in situ* fosforany pełniące funkcję w procesie b i o m i n e r a l i z a c j i kości. Hydrolizie poddawane są cząsteczki ATP bądź substraty pirofosforanowe²⁰.

AKTYWNOŚĆ BIAŁKA

Z punktu widzenia zastosowania białek w kontrolowanym dostarczaniu istotnym faktem jest zachowanie przez nie swojego stanu natywnego. W tym celu wyznacza się tak zwaną a k t y w n o ś ć e n z y m a t y c z n ą mierzoną jako liczba moli substratu, która została przekształcona w produkt w jednostce czasu oraz w odpowiednich warunkach reakcji enzymatycznej²¹. By oszacować wpływ nośnika liposomalnego na aktywność przyłączanego białka, przeprowadza się pomiary porównawcze: wyznacza się aktywność enzymatyczną nieprzyłączonej proteiny (traktowanej jako odnośnik, którego aktywność enzymatyczna stanowi 100%) zawierającej grupę GPI oraz aktywność dla proteiny zakotwiczonej w liposomie poprzez glikozylofosfatydyloinozytol. Podobne testy przeprowadza się także dla układów *layersome* zawierających to białko. Dzięki temu można porównać, jak zmieniała się wartość aktywności zamykanego białka początkowo po przyłączeniu go do dwuwarstwy pęcherzyka lipidowego, a następnie po pokryciu warstwą (warstwami) polielektrolitu (polielektrolitów).

W przypadku oszacowania aktywności enzymatycznej przyłączonego ALP wykorzystuje się metodę kolorymetryczną z użyciem p-nitrofenylofosforanu

¹⁸ J. Iqbal, *An enzyme immobilized micorassay in capillary electrophoresis for characterization and inhibition studies of alkaline phosphatases*, „Department of Pharmaceutical Sciences, Analytical Biochemistry” 2011, nr 414, s. 226–231.

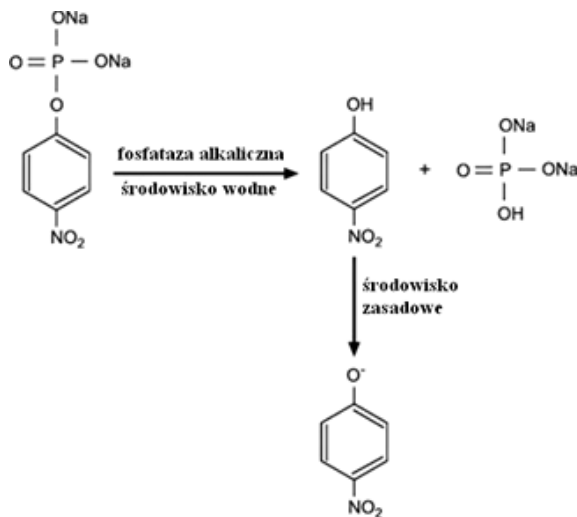
¹⁹ F. Cho-Ngwa, E. N. Mbuu, K. G. Nchamukong, V. P. K. Titanji, *Detection, purification and characterisation of a secretory alkaline phosphatase from Onchocerca species*, „Biotechnology Unit, Department of Biochemistry and Microbiology, Molecular and Biochemical Parasitology” 2007, s. 136–143.

²⁰ J. Iqbal, op. cit., s. 226–231; H. Orimo, *The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in heath and disease*, „Division of Medical and Biological Chemistry, Graduate School of Medicine, Journal of Nippon Medical School” 2010, s. 4–12; T. Osathanon, C. M. Giachelli, M. J. Somerman, *Immobilization of alkaline phosphatase on microporous nanofibrous fibrin scaffolds for bone engineering*, „Biomaterials” 2009, s. 4513–4521.

²¹ T. Osathanon, C. M. Giachelli, M. J. Somerman, op. cit., s. 4513–4521.

(p-NPP). W reakcji hydrolizy generowany jest p-nitrofenol (p-NP), który w środowisku zasadowym ulega deprotonacji z wytworzeniem p-nitrofenolanu. Jon ten cechuje się intensywnym pasmem absorpcji z maksimum przy 405 nm, co koresponduje z intensywnym żółtym zabarwieniem oznaczanych próbek ALP. Wzrost intensywności jest ściśle związany z wartością aktywności fosfatazy alkalicznej w badanych układach (Ryc. 6)²².

Rys.6. Schemat reakcji oznaczania ALP



Zmodyfikowany na podstawie: <http://www.gbiosciences.com/PhosphataseAssay-desc.aspx>

STABILNOŚĆ UKŁADÓW LAYERSOME ZAWIERAJĄCYCH BIAŁKO KOTWICZĄCE PRZEZ GPI

Z punktu widzenia zastosowania liposomów jako nośników w kontrolowanym uwalnianiu substancji biologicznie czynnych oprócz efektywności zamykania leku w nośniku niezwykle istotna jest także zdolność do utrzymania go wewnątrz pęcherzyka bądź na jego powierzchni (w przypadku białek wiążących się z dwuwarstwą lipidową przez GPI). To, jak szybko substancja biologicznie czynna jest uwalniana do środowiska zewnętrznego, zależy od przepuszczalności dwuwarstwy lipidowej oraz stabilności układu. Tę ostatnią mierzy się w obecności czynnika powodującego lizę błony komórkowej. Jest nim niejonowy surfaktant Triton X-100 stosowany w biologii do izolacji białek błonowych.

²² J. Iqbal, op. cit., s. 226–231.

Ze względu na obojętny charakter chemiczny tego detergentu izolowane proteiny zachowują swój stan natywny²³. Po każdorazowym dodatku czynnika destabilizującego wykonuje się pomiary spektrofotometryczne gęstości optycznej układu²⁴. W tym celu mierzy się absorbancję próbki przy dwóch długościach fali. Pierwsza z nich (320 nm) odpowiada tzw. ogonowaniu widma liposomów związanemu z rozpraszaniem. Druga wartość absorbancji przypada natomiast na bliską podczerwień (800 nm) i stanowi swoiste tło. W trakcie eksperymentu należy uwzględnić całkowitą objętość próbki odpowiadającą danemu etapowi miareczkowania. Wiadomo, że liposomy jako cząstki nanometrycznych rozmiarów są zdolne do rozpraszania wiązki światła. Jeśli na taki układ zadziała się czynnikiem dezintegrującym dwuwarstwą lipidową, dochodzi do rozpadu liposomów, a co za tym idzie do spadku intensywności rozpraszania światła przechodzącego przez próbkę. Sumaryczna gęstość optyczna układu ulega zatem znacznemu obniżeniu. Ze względu na tendencję Tritonu X-100 do tworzenia micel przy odpowiedniej wartości krytycznego stężenia micelizacji (CMC) gęstość optyczna miareczkowanego układu nie osiągnie wartości zerowej. W identyczny sposób mierzy się także stabilność układów *layersome*: liposom (zawierający przyłączone białko)-polimer.

WYNIKI

Wykonano pomiary stabilności układów *layersome* zawierających białko ALP. W tym celu przygotowano próbki liposomów o składzie PC:CHOL 9:1 (stosunek objętościowy) zawierających przyłączoną fosfatazę alkaliczną. Liposomy otrzymywano metodą hydratacji suchego filmu lipidowego roztworem białka, a następnie sonikowano próbkę przez 10 min. Podczas sonikacji próbka była chłodzona w łaźni lodowej. Nieprzyłączone do liposomów białko odwirowano przy użyciu koncentratorów wirówkowych VIVASPIN 2 zawierających membranę o wielkości porów 100,000 MWCO. Kolejnym krokiem było dodawanie zoptymalizowanej objętości roztworu polimeru (pochodnych poli(alkoholu winylowego)) o stężeniu 1 mg/ml. Próbkę liposomów z polimerem inkubowano 12 godzin. Efektywność pokrywania liposomów polimerami skontrolowano przy użyciu techniki dynamicznego rozpraszania światła (DLS). Zmierzono wartości potencjałów zeta układów *layersome*, jak również wielkości nanocząstek. Dane te zestawiono poniżej (Tab. 1, Ryc. 7).

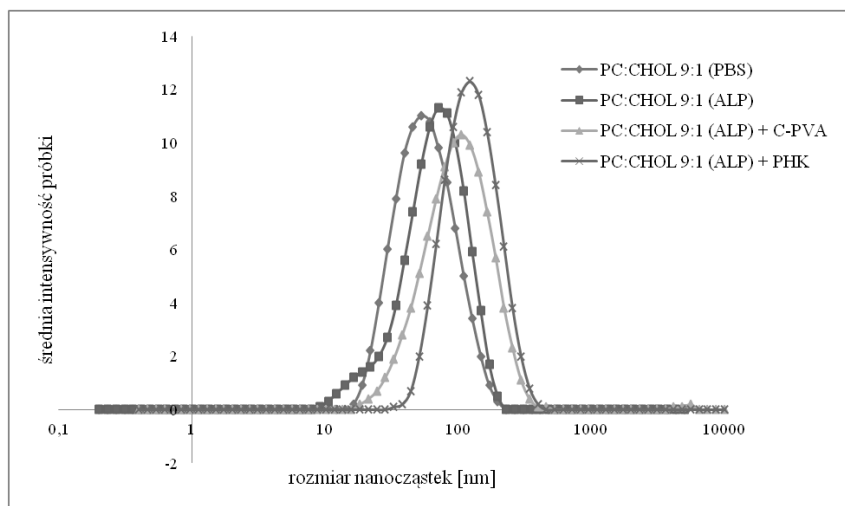
²³ M. Bolean, A. M. S. Simão, B. Z. Favarin, J. L. Millán, P. Ciancaglini, *Thermodynamic properties and characterization of proteoliposomes rich in microdomains carrying alkaline phosphatase*, „Biophysical Chemistry” 2011, nr 158, s. 111–118.

²⁴ O. M. Atrooz, *Effects of Alkylresorcinolic Lipids Obtained from Acetonic Extract of Jordanian Wheat Grains on Liposome Properties*, „International Journal of Biological Chemistry” 2011, nr 5, s. 314–321; Y. Fukui, K. Fujimoto, *The Preparation of Sugar Polymer-Coated Nanocapsules by the Layer-by-Layer Deposition on the Liposome*, „Langmuir” 2009, nr 17, s. 10020–10025.

Tab. 1. Zmiany wartości potencjału zeta układów *layersome*

Nazwa układu	Potencjał zeta [mV]
PC:CHOL 9:1 (PBS)	-18,4
PC:CHOL 9:1 (ALP)	-34,7
PC:CHOL 9:1 (ALP) + C-PVA	-23,2
PC:CHOL 9:1 (ALP) + PHK	-30,5

Źródło: Opracowanie własne

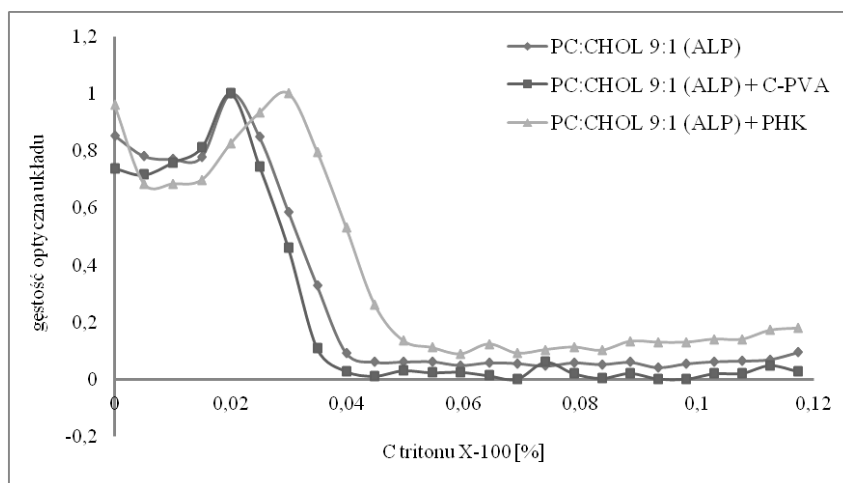
Ryc. 7. Rozkład rozmiarów układów *layersome* oraz liposomów niepokrytych polimerami

Źródło: Opracowanie własne

Otrzymane układy liposomalne zróżnicowane są pod względem zarówno rozmiarów, jak i potencjałów zeta. Największe nanocząstki otrzymano w przypadku liposomów pokrywanych polimerem amfifilowym (122,4 nm). Także wartość potencjału zeta układów *layersome* wskazuje, że pokrywanie polimerem hydrofobowo-kationowym zapewnia otrzymanie stabilniejszych układów w porównaniu do systemów zawierających C-PVA.

Układy *layersome* zawierające ALP miareczkowano niejonowym surfaktantem Tritonem X-100 o stężeniu 5%. Po każdorazowym dodatku titranta próbka była starannie mieszana, a następnie wykonywano pomiary absorpcji w zakresie 190–800 nm. Odczytywano wartość absorbancji dla dwóch długości fali: 320 nm oraz 800 nm. Dane te posłużyły do wyznaczenia wartości gęstości optycznej układu (Ryc. 8).

Ryc.8. Zmiany wartości gęstości optycznej układów *layersome* zawierających fosfatazę alkaliczną



Źródło: Opracowanie własne

Na powyższym wykresie widać wyraźnie, że układ *layersome* zawierający polimer amfifilowy cechuje znaczny wzrost stabilności. Jest to związane z obecnością długich łańcuchów alkilowych wnikających w strukturę dwuwarstwy lipidowej. Dzięki nim polimer hydrofobowo-kationowy (PHK) może swobodnie inkorporować w dwuwarstwę liposomu.

Wykonano także pomiary wartości aktywności enzymatycznej przyłączonego białka ALP w układach liposom-polimer. Wyniki zestawiono poniżej w tabeli.

Tabela 2. Zmiany wartości aktywności enzymatycznej białka ALP w wybranych układach *layersome*

Nazwa układu	Wartość aktywności ALP [U/L]
PC:CHOL 9:1 (ALP)	8,63
PC:CHOL 9:1 (ALP) + C-PVA	6,75
PC:CHOL 9:1 (ALP) + PHK	11,67
Wodny roztwór białka ALP (odnośnik)	12,38

Źródło: Opracowanie własne

Pokrywanie powierzchni liposomów polielektrolitem (C-PVA) nieposiadającym ugrupowań kotwiczących w dwuwarstwie lipidowej (jak długie łańcuchy węglowodorowe) powoduje zazwyczaj znaczną utratę aktywności przyłączonego białka. Jest to wyniki intensywnych oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy układami *layersome* (w szczególności przyłączoną do powierzchni fosfatazą alkaliczną) a polimerem kationowym. Sytuacja wygląda korzystniej podczas zastosowania polimerów amfifilowych (jak np. PHK), gdzie oddziaływanie elektrostatyczne jest ograniczone poprzez wnikanie łańcuchów węglowodorowych polimeru w strukturę dwuwarstwy pęcherzyka liposomalnego.

PODSUMOWANIE

Wraz z odkryciem u organizmów eukariotycznych obecności białek kotwiczących poprzez ugrupowanie GPI w dwuwarstwie lipidowej technologia liposomalna zaczęła poszerzać wachlarz swoich zastosowań. Początkowo wierzono, że białka te są przyłączone kowalencyjnie do powierzchni błony komórkowej. W późniejszych latach określono strukturę kotwicy glikozylofosfatydyloinozytolowej (GPI). Od tego momentu nastąpił rozwój procedur umożliwiających kontrolowane dostarczanie białek błonowych kotwiczących w liposomach poprzez GPI. Problem, z jakim trzeba się jednak zmierzyć, to ograniczona stabilność układów liposom-białko. Aby zwiększyć odporność nośnika i substancji biologicznie aktywnej na zmiany środowiska reakcyjnego, takie jak np. temperatura, pH czy obecność innych substancji w roztworze, można pokrywać liposomy zawierające białko przy użyciu naturalnych lub syntetycznych polielektrolitów. Należy przy tym zwrócić uwagę, że nie zawsze wzrost stabilności układu jest skorelowany ze wzrostem bądź stabilizacją aktywności enzymatycznej przyłączonego białka. Pomiar stabilności można wykonywać za pomocą wielu dostępnych technik. Jedną z najwygodniejszych jest pomiar zmian gęstości optycznej układu w trakcie miareczkowania niejonowym surfaktantem destabilizującym dwuwarstwę lipidową i uwalniającym przyłączone białko.

ABSTRACT

This paper presents the development of novel liposomal nanocarriers which can be used in delivery of biologically-active substances, such as proteins. There is a great interest in liposomal carriers, which could be used for medical and pharmacological applications. However, because of low stability of liposomes, such applications are challenging. Certain external factors, such as pH, temperature or the presence of other substances in the environment may have a damaging effect on the lipid vesicles.

Proteins are known to play an essential role in the functioning of living organisms. They have mechanical-structural functions, but they can also act as biocatalysts (enzymes), neurotransmitters, or are involved in the transport of small molecules and ions in tissue. The interest in GPI-linked proteins is related to their ability to incorporate in the lipid bilayer. They have a

glycosylphosphatidylinositol anchor with two long alkyl chains. These chains can incorporate in the cell membrane, thus allowing their attachment to the outer surface of vesicles.

Coating them with polyelectrolytes can increase the stability of liposomes. It was found that some polymeric films have the ability to stabilize the liposomal nanocarriers of proteins. That can be correlated with the value of the zeta potential of polymer which coats liposomes, as well as with the shape of a polymeric chain. The polymeric coating can be carefully chosen to ensure that the stabilizing effect will be associated with protein protection reflected in its high enzymatic activity.

WYKAZ SKRÓTÓW

ALP	fosfataza alkaliczna – białkowy enzym hydrolityczny
APC	(ang. <i>antigen presenting cell</i>) komórka prezentująca antygen
BSA	albumina surowicy bydłowej
C-PVA	kationowa pochodna poli(alkoholu winylowego) [PVA] powstała przez modyfikację PVA za pomocą chlorku glicydylotrimetyloamoniowego [GTMAC]
GPI	ugrupowanie glikozylofosfatydyloinozytolowe
MTX	metotrexat
PEG	glikol polietylenowy
PHK	hydrofobowo-kationowa pochodna poli(alkoholu winylowego) [PVA] powstała przez modyfikację PVA za pomocą 1-bromoheksadekanu oraz chlorku glicydylotrimetyloamoniowego [GTMAC]
p-NPP	p-nitrofenylofosforan
p-NP	p-nitrofenol

BIBLIOGRAFIA

1. Angelini G., Boncompagni S., De Maria P., Fontana A., Gasbarri C., Siani G., *Kinetic evolution of the effect of layer by layer deposition of polyelectrolytes on the stability of POPC liposomes*, „Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects” 2008, nr 322, s. 234–238.
2. Atrooz O. M., *Effects of Alkylresorcinolic Lipids Obtained from Acetonic Extract of Jordanian Wheat Grains on Liposome Properties*, „International Journal of Biological Chemistry” 2011, nr 5, s. 314–321.
3. Bendas G., Krause A., Bakowsky U., Vogel J., Rothe U., *Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique*, „International Journal of Pharmaceutics” 1999, nr 181, s. 79–93.
4. Bolean M., Simão A. M. S., Favarin B. Z., Millán J. L., Ciancaglini P., *Thermodynamic properties and characterization of proteoliposomes rich in microdomains carrying alkaline phosphatase*, „Biophysical Chemistry” 2011, nr 158, s. 111–118.
5. Cho-Ngwa F., Mbua E. N., Nchamukong K. G., Titanji V. P. K., *Detection, purification and characterisation of a secretory alkaline phosphatase from Onchocerca species*, „Biotechnology Unit, Department of Biochemistry and Microbiology, Molecular and Biochemical Parasitology” 2007, s. 136–143.
6. Ciobanu M., Heurtault B., Ruhlmann C., Muller C. D., Frisch B., *Layersome: Development and optimization of stable liposomes as drug delivery system*, „International Journal of Pharmaceutics” 2007, nr 344, s. 154–157.

7. Decher G., Schlenoff J. B., *Multilayer thin films*, Wiley-VCH 2003.
8. Eisenhaber B., Maurer-Stroh S., Novatchkova M., Schneider G., Eisenhaber F., *Enzymes and auxiliary factors for GPI lipid anchor biosynthesis and post-translational transfer to proteins*, „BioEssays” 2003, nr 25, s. 367–385.
9. Feng C., Zhang C., Shao X., Liu Q., Qian Y., Feng L., Chen J., Zha Y., Zhang Q., Jiang X., *Enhancement of nose-to-brain delivery of basic fibroblast growth factor for improving rat memory impairments induced by co-injection of β -amyloid and ibotenic acid into the bilateral hippocampus*, „International Journal of Pharmaceutics” 2012, nr 423, s. 226–234.
10. Feng S.-S., Ruan G., Li Q.-T., *Fabrication and characterizations of a novel drug delivery device liposomes-in-microsphere (LIM)*, „Biomaterials” 2004, nr 25, s. 5181–5189.
11. Ferguson M. A. *The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research*, „Journal of Cell Science” 1999, nr 112, s. 2799–2809.
12. Ferguson M. A., Homans S. W., Dwek R. A., Rademacher T. W., *Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein to the membrane*, „Science” 1988, nr 239, s. 753–759.
13. Ferguson M. A., Low M. G., Cross G. A., *Glycosylsn-1,2-dimyristylphosphatidylinositol is covalently linked to Trypanosoma brucei variansurface glycoprotein*, „The Journal of Biological Chemistry” 1985, nr 260, s. 14547–14555.
14. Fukui Y., Fujimoto K., *The Preparation of Sugar Polymer-Coated Nanocapsules by the Layer-by-Layer Deposition on the Liposome*, „Langmuir” 2009, nr 17, s. 10020–10025.
15. *GPI-anchored biomolecules* in *oVerView*, in *GPI anchored membrane proteins and carbohydrates*, eds. D. C. Hoessli, S. Ilangumaran, 1999, s 1–14.
16. Helenius A., Simons K., *Solubilization of membranes by detergents*, „Biochimica et Biophysica Acta” 1975, nr 415 (1), s. 29–79.
17. Homans S. W., Ferguson M. A., Dwek R. A., Rademacher T. W., Anand R., Williams A. F., *Complete structure of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of rat brain Thy-1 glycoprotein*, „Nature” 1988, nr 333, s. 269–272.
18. Immordino M. L., Dosio F., Cattel L., *Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential*, „International Journal of Nanomedicine” 2006, s. 297–315.
19. Iqbal J., *An enzyme immobilized micorassay in capillary electrophoresis for characterization and inhibition studies of alkaline phosphatases*, „Department of Pharmaceutical Sciences, Analytical Biochemistry” 2011, nr 414, s. 226–231.
20. Kopczyński P., *Możliwości zastosowania wybranych markerów obrotu kosztowego w stomatologii*, „Nowiny Lekarskie” 2004, nr 73, s. 318–320.
21. Lasic D., Ceh B., *Stealth Liposomes: From Theory To Product*, „Advanced Drug Delivery Reviews” 1994, nr 24s. 165–177.
22. Machluf M., Regev O., Peled Y., Kost J., Cohen S., *Characterization of microencapsulated liposome system for the controlled delivery of liposome-associated macromolecules*, „Journal of Controlled Release” 1996, nr 43, s. 35–45.
23. Marquez L., Mauad de Abreu F. A., Ferreira C., Alves G., Miziara M., Alves J., *Enhanced bone healing of rat tooth sockets after administration of epidermal growth factor (EGF) carried by liposome*, „Injury” 2012, w druku.
24. Murray E. W., Robbins S. M., *Antibody Cross-linking of the Glycosylphosphatidylinositol-linked Protein CD59 on Hematopoietic Cells Induces Signaling Pathways Resembling Activation by Complement*, „The Journal of Biological Chemistry” 1998, nr 273 s. 25279–25284.

25. Nakanishi T., Hayashi A., Kunisawa J., Tsutsumi Y., Tanaka K., Yashiro Ohtani Y., Nakanishi M., Fujiwara H., Hamaoka T., Mayumi T., *Fusogenic liposomes efficiently deliver exogenous antigen through the cytoplasm into the MHC class I processing pathway*, „European Journal of Immunology” 2000, nr 30, s. 1740–1747.
26. Nishioka T., Tomatsu S., Gutierrez M. A., Miyamoto K. I., Trandafirescu G. G., Lopez P. L. C. et al., *Enhancement of drug delivery to bone: characterization of human tissue-nonspecific alkaline phosphatase tagged with an acidic oligopeptide*, „Molecular Genetics and Metabolism” 2006, nr 88, s. 244–255.
27. Nosjean, O., Briolay A., Roux, B., *Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions*, „Biochimica et Biophysica Acta” 1997, nr 1331, s. 153–186.
28. Orimo H., *The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in health and disease*, „Division of Medical and Biological Chemistry, Graduate School of Medicine, Journal of Nippon Medical School” 2010, s. 4–12.
29. Osathanon T., Giachelli C. M., Somerman M. J., *Immobilization of alkaline phosphatase on microporous nanofibrous fibrin scaffolds for bone engineering*, „Biomaterials” 2009, s. 4513–4521.
30. Petty H., *Characterization of Cellular Proteins*, „Current Protocols in Cell Biology” 1998, s. 5.1.1–5.1.10.
31. Poelstra K., Bakker W. W., Klok P. A., Hardonk M. J., Meijer D. K., *A physiologic function for alkaline phosphatase: endotoxin detoxification*, „Laboratory Investigation” 1997, nr 76, s. 319–327.
32. Ronzon F., Morandat S., Roux B., Bortolato M., *Insertion of a Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Enzyme into Liposomes*, „The Journal of Membrane Biology” 2004, nr 197, s. 169–177.
33. SooJee S., Culver L., Li Y., Douglas E. P., Gower L. B., *Biomimetic mineralization of collagen via an enzyme-aided PILP process*, „Journal of Crystal Growth” 2010, nr 312, s. 1249–1256.
34. Stebelska K., Wyrozumska P., Grzybek M., Sikorski A. F., *Characterization and medical applications of liposome constructions*, „Advances in Clinical and Experimental Medicine” 2002, nr 11 (2), s. 229–242.
35. Suzuki K., Okumura Y., *GPI-Linked Proteins Do Not Transfer Spontaneously from Erythrocytes to Liposomes. New Aspects of Reorganization of the Cell Membrane*, „Biochemistry” 2000, nr 39, s. 9477–9485.
36. Takeuchi H., Yamamoto H., Toyoda T., Toyobuku H., Hino T., Kawashima Y., *Physical stability of size controlled small unilamellar liposomes coated with a modified polyvinyl alcohol*, „International Journal of Pharmaceutics” 1998, nr 164, s. 103–111.
37. Tiede A., Bastisch I., Schubert J., Orlean P., Schmidt R. E., *Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols in mammals and unicellular microbes*, „The Journal of Biological Chemistry” 1999, nr 380, s. 503–523.
38. Xiang Q., Xiao J., Zhang H., Zhang X., Lu M., Zhang H., Su Z., Zhao W., Lin C., Huang Y., Li X., *Preparation and characterisation of bFGF-encapsulated liposomes and evaluation of wound-healing activities in the rat*, „Burns” 2011, nr 37, s. 886–895.
39. Xiaomei M., Zhensheng Z., *Preparation and properties of poly(vinyl alcohol)-stabilized liposomes*, „International Journal of Pharmaceutics” 2006, nr 318, s. 55–61.
40. Zimecki M., Artym J., *Effect of methotrexate on the immune response in selected experimental models*, „Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej” 2004, nr 58, s. 226–235.